

**Strukturelle und funktionelle Charakterisierung
der Sirohäm-Decarboxylasen NirDLGH aus
Pseudomonas aeruginosa und NirDL aus
*Hydrogenobacter thermophilus***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Kristin Haufschildt
aus Bremerhaven

1. Referentin:

Professorin Dr. Gunhild Layer

2. Referent:

Professor Dr. Dieter Jahn

eingereicht am:

27.04.2016

mündliche Prüfung (Disputation) am:

27.06.2016

Druckjahr 2016

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Haufschildt, K., Schmelz, S., Kriegler, T. M., Neumann, A., Streif, J., Arai, H., Heinz, D. W. & Layer, G.: The Crystal Structure of Siroheme Decarboxylase in Complex with Iron-Uroporphyrin III Reveals Two Essential Histidine Residues.
Journal of molecular biology 426: 3272-3286 (2014).

Kühner, M., Haufschildt, K., Neumann, A., Storbeck, S., Streif, J. & Layer, G.:
The Alternative Route to Heme in the Methanogenic Archaeon *Methanosarcina barkeri*.
Archaea 2014: 327637-327648 (2014).

Tagungsbeiträge

Haufschildt, K., Walther, J., Streif, J., Neumann, A. & Layer, G.: NirDLGH – transcriptional regulator and catalytic enzyme of the heme *d*₁-biosynthesis (Vortrag)
Tetrapyrrol-Retreat, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig (2013).

Posterbeiträge

Haufschildt, K., Schmelz, S., Kriegler, T. M., Walther, J., Neumann, A., Heinz, D. W. & Layer, G.: Characterization of the heme d₁ biosynthesis enzyme NirDL/NirDLGH.
Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Dresden (2014)

Haufschildt, K., Schmelz, S., Kriegler, T. M., Walther, J., Neumann, A., Heinz, D. W. & Layer, G.: Characterization of the heme d₁ biosynthesis enzyme NirDL/NirDLGH. Gordon Research Conference (GRC) – Chemistry and Biology of Tetrapyrroles, Salve Regina University, Newport, RI, USA (2014)

Haufschildt, K., Ressel, S., Schmelz, S., Kriegler, T. M., Neumann, A. & Layer, G.: The siroheme decarboxylase NirDLGH_{P.a.} / NirDL_{H.th.}. Mikrobiologie-Retreat, Goslar (2013).

Haufschildt, K., Schmelz, S., Kriegler, T. M., Walther, J., Neumann, A., Heinz, D. W. & Layer, G.: Biosynthesis of heme d₁ in *P. aeruginosa*. Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM) in collaboration with the Royal Netherlands Society for Microbiology (KNVM), Bremen (2013).

Haufschildt, K., Walther, J., Streif, J., Neumann, A. & Layer, G.: The role of NirDLGH during the biosynthesis of heme d₁ in *P. aeruginosa*. (Poster) Mikrobiologie-Retreat, Warberg (2012).

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Der Stickstoffkreislauf.....	1
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.3 Der anaerobe Stoffwechsel von <i>P. aeruginosa</i>	3
1.3.1 Fermentation	4
1.3.2 Denitrifikation.....	4
1.4 Das <i>nir</i> -Operon in <i>P. aeruginosa</i>	6
1.4.1 Die Cytochrom <i>cd</i> ₁ Nitritreduktase.....	7
1.4.2 Die Cytochrome NirM und NirC	8
1.5 Die Tetrapyrrole – Farben des Lebens.....	8
1.5.1 Die Grundstruktur	9
1.5.2 Die Biosynthese von Uroporphyrinogen III	10
1.5.3 Die Häm <i>d</i> ₁ -Biosynthese.....	12
1.6 Die Häm <i>d</i> ₁ -Biosyntheseenzyme	13
1.6.1 Die Methyltransferase NirE	13
1.6.2 Das Eisen-Schwefel-Protein NirJ	14
1.6.3 Das Lipoprotein NirF.....	15
1.6.4 Die periplasmatische Dehydrogenase NirN.....	15
1.6.5 Die Sirohäm-Decarboxylase NirDLGH.....	16
2. Zielsetzung.....	18
3. Material und Methoden.....	19
3.1 Geräte.....	19
3.2 Chemikalien	20
3.3 Kommerzielle Kits und Oligonukleotide.....	21
3.3.1 Kommerzielle Kits.....	21
3.3.2 Oligonukleotide	21
3.4 Bakterienstämme und Plasmide.....	23

3.5 Mikrobiologische Techniken.....	28
3.5.1 Sterilisation.....	28
3.5.2 Bakterienkultivierung auf Agarplatten.....	28
3.5.3 Bakterienkultivierung in Flüssigkultur.....	29
3.5.4 Antibiotika.....	29
3.5.5 Anlegen von Glycerinkulturen	30
3.5.6 Bestimmung der Zelldichte	30
3.5.7. Anaerobe Wachstumskurven von <i>P. aeruginosa</i>	30
3.6 Molekularbiologische Techniken	31
3.6.1 Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> Zellen (CaCl ₂ -Methode)	31
3.6.2 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	32
3.6.3 Herstellung elektrokompeter <i>P. aeruginosa</i> -Zellen	32
3.6.4 Elektroporation von <i>P. aeruginosa</i>	32
3.6.5 Biparental Mating.....	33
3.6.6 Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	34
3.6.7 Agarosegelelektrophorese	35
3.6.8 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA.....	36
3.6.9 Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifikation	36
3.6.10 Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	37
3.6.11 Reinigung von DNA-Fragmenten	37
3.6.12 Ligation von DNA-Fragmenten	37
3.6.13 Ortsgerichtete Mutagenese	37
3.6.14 Bestimmung der DNA-Sequenz.....	38
3.7 Biochemische Techniken	39
3.7.1 β -Galactosidase Enzymtest	39
3.7.2 Heterologer Proteinproduktionstest zur Ermittlung geeigneter Produktionsbedingungen	40
3.7.3 Proteinproduktion von NirDLGH (<i>P. aeruginosa</i>)	40
3.7.4 Proteinproduktion von NirDL (<i>H. thermophilus</i>) und der NirDL-Varianten.	41

3.7.5 Proteinproduktion von CysG	41
3.7.6 Zellernte	41
3.7.7 Zellaufschluss und Zentrifugation	42
3.7.8 Affinitätschromatographie mittels Nickel-Chelat-Komplex	42
3.7.9 Gelpermeationschromatographie	43
3.7.10 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	44
3.7.11 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	45
3.7.12 Konzentrierung von Proteinlösungen	46
3.7.13 Umpuffern von Proteinlösungen.....	46
3.7.14 Western Blot	46
3.7.15 Extraktion von Tetrapyrrolen.....	47
3.7.16 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	48
3.7.17 Massenspektrometrie	49
3.7.18 <i>In vivo</i> Enzymaktivitätstest.....	49
3.7.19 Sirohäm-Decarboxylase-Aktivitätsassay	50
3.7.20 UV/Vis-Spektroskopie.....	51
3.7.21 Proteinkristallisation	51
4. Ergebnisse und Diskussion.....	53
4.1 NirDLGH aus <i>P. aeruginosa</i> als Transkriptionsregulator	53
4.1.1 Analyse der NirDLGH- und IHF-Bindestelle mittels Reportergenkonstrukten in <i>P. aeruginosa</i>	53
4.1.2 Der Einfluss von NirL und NirH auf die Promotoraktivität der <i>nirJEN</i> -Gene	57
4.2 NirDLGH aus <i>P. aeruginosa</i> als Sirohäm-Decarboxylase	65
4.2.1 <i>In vivo</i> -Enzymaktivitätsanalyse für NirDLGH aus <i>P. aeruginosa</i>	65
4.2.2 Heterologe Produktion und Reinigung von NirDLGH aus <i>P. aeruginosa</i>	69
4.2.3 <i>In vitro</i> -Enzymaktivität von NirDLGH aus <i>P. aeruginosa</i>	71
4.2.4 <i>In vitro</i> -Enzymaktivität von NirDLGH aus <i>P. aeruginosa</i> in Anwesenheit von DNA-Fragmenten	75

4.3 Die Sirohäm-Decarboxylase NirDL aus <i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	77
4.3.1. Heterologe Produktion und Reinigung von NirDL aus <i>H. thermophilus</i>	77
4.3.2 <i>In vitro</i> -Enzymaktivität von NirDL aus <i>H. thermophilus</i>	79
4.3.3 Die Struktur von NirDL aus <i>H. thermophilus</i>	81
4.3.4 Die Umsetzung des Substratanalogons FeUroIII durch NirDL	89
4.3.5 Die Varianten von NirDL aus <i>H. thermophilus</i>	90
4.3.6 <i>In vitro</i> -Enzymaktivität der NirDL-Varianten	94
4.3.7 Substratbindung des wt-NirDL und den NirDL-Varianten.....	99
4.3.8 Beteiligung der Aminosäuren an Koordination oder Decarboxylierung des Substrats SH	104
4.3.9 Potentieller Reaktionsmechanismus von NirDL	108
5. Zusammenfassung.....	113
6. Summary	115
7. Ausblick.....	117
8. Literaturverzeichnis.....	118
9. Anhang	127
Abbildungsverzeichnis	129
Tabellenverzeichnis	132
Danksagung.....	133

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
ALA	5-Aminolävulinsäure
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APB	Alkaline Phosphatase Puffer
APS	Aminoperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indocylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bw	<i>backward</i>
CIP	<i>alkaline phosphatase, calf intestinal</i>
Cml	Chloramphenicol
Da	Dalton
DDSH	12,18-Didecarboxy-Sirohäm
Δ	Deletionsmutante
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
Dig	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-Tetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>lat. et alteri</i>
FeUroIII	Eisen-Uroporphyrin III
fw	<i>foreward</i>
g	Erdbeschleunigung (g = 9,81 m/s ²)
GPC	Gelpermeationschromatographie

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
His-Tag	Polyhistidin-Sequenz
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HTH	Helix-Turn-Helix
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
LB	Luria Bertani
M	Marker
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDSH	Monodecarboxy-Sirohäm
M _r	Relative molekulare Masse
MS	Massenspektrometrie
Nar	Nitratreduktase
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Nir	Nitritreduktase
OD _{λ}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ [nm]
ONPG	o-Nitrophenol- β -D-Galaktopyranosid
PAO1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBS	Ribosomenbindestelle
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehung pro Minute
rev	<i>reverse</i>
SAD	<i>single-wavelength anomalous dispersion</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH	Sirohäm
SUMT	SAM-abhängige Uroporphyrinogen III-Methyltransferase
SV	Säulenvolumen
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TBE	TRIS-Borat-EDTA Puffer
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonat
U	Unit(s)
ü. N.	über Nacht
UV/Vis	<i>ultraviolet/visible</i>
WT	Wildtyp
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

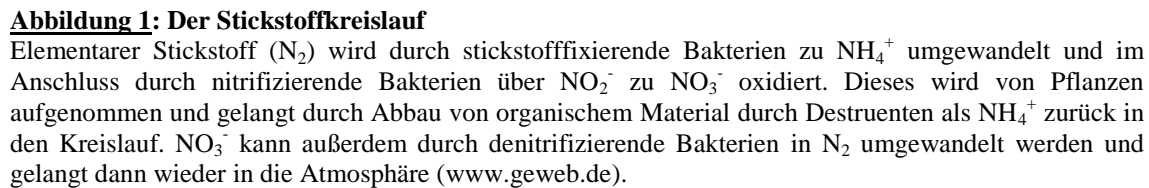
1.1 Der Stickstoffkreislauf

Die Atmosphäre der Erde besteht zu circa 78 % aus Stickstoff. In seiner elementaren Form als N_2 ist es allerdings für viele Lebewesen unseres Planeten nicht direkt verfügbar, sondern muss zuerst in Ammonium oder Nitrat umgewandelt werden.

Durch die atmosphärische Deposition gelangt Stickstoff, in Form von Ammonium (NH_4^+) und Nitrat (NO_3^-), im Regen gelöst oder durch Feinstaubablagerungen, in den Boden. Eine deutlich größere Bedeutung hat allerdings die Stickstofffixierung durch symbiontisch und nicht symbiontisch lebende Bakterien, wie z.B. Vertreter der Gattung *Azotobacter* oder der Familie *Rhizobiaceae* (Madigan *et al.*, 2006). Diese setzen Ammoniak (NH_3) frei, der unter den vorherrschenden Bedingungen in sauren oder neutralen Böden durch Aufnahme eines Protons zu NH_4^+ reagiert. Durch nitrifizierende Bakterien wird NH_4^+ über Nitrit (NO_2^-) zu Nitrat (NO_3^-) oxidiert. Sowohl freigesetztes NH_4^+ als auch NO_3^- kann von Pflanzen assimiliert werden.

Unter anaeroben Bedingungen sind denitrifizierende Bakterien in der Lage, NO_3^- anstatt Sauerstoff als Elektronenakzeptor zur Energiegewinnung zu nutzen, wobei letztendlich elementarer Stickstoff in die Atmosphäre zurück gelangt.

Durch die Zersetzung von organischem Material von Destruenten gelangt der Stickstoff in Form von NH_4^+ wieder in den Boden zurück (Campbell *et al.*, 2003). In Abbildung 1 ist der Stickstoffkreislauf schematisch dargestellt.



Pseudomonas aeruginosa ist ein Bakterium aus der Klasse der γ -*Proteobacteria* und gehört zu der Familie der *Pseudomonadaceae*. Wie alle Vertreter dieser Klasse ist *P. aeruginosa* gramnegativ. Es ist 0,5-1 μm x 1-4 μm groß, stäbchenförmig und polar begeißelt. *P. aeruginosa* ist ein opportunistisches Human-, Pflanzen- und Tierpathogen und ist weit verbreitet in Böden und Gewässern.

Als Humanpathogen spielt *P. aeruginosa* eine Rolle als nosokomialer Keim, welcher eine Vielzahl von Infektionen der Haut, der Augen, des Weichgewebes und des äußeren Gehörgangs auslösen kann (Stryjewski and Sexton, 2003). Brandwunden, die infiziert

sind, weisen eine grün-bläuliche Färbung auf, welche auf das Siderophor Pyoverdin und den Farbstoff Pyocyanin, zurückzuführen sind (Meyer *et al.*, 1996). Bei dauerhaft katheterisierten Patienten kommt es häufig zu einer chronischen Infektion der Harnwege mit *P. aeruginosa* (Liedberg and Lundeberg, 1989). Eine besonders große Bedeutung hat die Infektion des Respirationstraktes bei der autosomal-rezessiv vererbten zystischen Fibrose. Der *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR-) Kanal der Patienten ist defekt, was zu einer verminderten Cl⁻-Sekretion führt. Dadurch wird das Sekret in den Lungen sehr zähflüssig und es kommt zur Zystenbildung. Der zähflüssige Mucus und somit Schmutzstoffe können nicht mehr durch die Zilien aus der Lunge heraus transportiert werden (Klinke *et al.*, 2005). Dieser Schleim wird unter anderem von *P. aeruginosa* besiedelt und dient als Nährstoffquelle. Innerhalb des angelagerten Mucus bildet sich auch wegen der Besiedlung durch Bakterien als Biofilm ein Sauerstoffgradient bis hin zu vollständig anaeroben Bereichen. Zusätzlich bildet *P. aeruginosa* unter diesen Bedingungen vermehrt Alginat, sodass die Schleimschicht weiter anwächst und die Viskosität weiter zunimmt.

Die Ausbildung von Biofilmen und die hohe Resistenz gegenüber Antibiotika erschwert die Behandlung der *P. aeruginosa*-Infektionen. Die Zellen in einem Biofilm besitzen eine bis zu 1000-fach höhere Resistenz als planktonisch wachsende Zellen (Mah *et al.*, 2003). Diese höhere Resistenz ist auf die selbstproduzierte Matrix, bestehend aus Polysacchariden, Proteinen und DNA, in der sich die Zellen befinden, zurückzuführen (Høiby *et al.*, 2010). Darüber hinaus sorgen im Genom kodierte β -Lactamasen und Effluxpumpen für einen schnellen Abbau oder Ausschleusen der Antibiotika und machen sie somit unwirksam (Livermore, 1995; Poole, 2001).

1.3 Der anaerobe Stoffwechsel von *P. aeruginosa*

Unter aeroben Bedingungen nutzt *P. aeruginosa* die aerobe Atmung um Energie zu gewinnen, da dieser Stoffwechselprozess die höchste ATP-Ausbeute liefert. Liegt Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor nicht in ausreichenden Mengen vor, besitzt *P. aeruginosa* weitere Stoffwechselwege, um unter anaeroben Bedingungen zu wachsen. Dabei können sowohl Nitrat oder Nitrit als Elektronenakzeptor während der Denitrifikation genutzt, wie auch Arginin und Pyruvat fermentiert werden.

1.3.1 Fermentation

Stehen weder Sauerstoff, Nitrat oder Nitrit als terminale Elektronenakzeptoren zur Verfügung, wird in *P. aeruginosa* unter Anwesenheit von Arginin die Produktion der Proteine für die Argininfermentation induziert. Dabei wird L-Arginin durch die Arginindeiminase, die katabolische Ornithin-Carbamoyltransferase und die Carbamatkinase zu L-Ornithin umgewandelt und pro Molekül Arginin wird ein ATP gebildet. Diese Proteine sowie der Arginin-Ornithin-Antiporter werden durch das Operon *arcDABC* kodiert (Williams *et al.*, 2007).

Bei der Pyruvatfermentation wird Pyruvat zu Lactat, Succinat und Acetat umgesetzt. An dieser Umsetzung sind unterschiedliche Proteine beteiligt, welche durch verschiedene Genloci kodiert werden. Anders als bei der Argininfermentation, bewirkt die Pyruvatfermentation kein Wachstum, sie dient jedoch dem Langzeitüberleben von *P. aeruginosa* (Williams *et al.*, 2007).

1.3.2 Denitrifikation

Unter anaeroben Bedingungen ist *P. aeruginosa* in der Lage seine Energie mittels Denitrifikation zu gewinnen. Dies ist nach der aeroben Atmung der effizienteste Stoffwechselweg. Dabei wird Nitrat (NO_3^-) über die Zwischenprodukte Nitrit (NO_2^-), Stickstoffmonoxid (NO) und Distickstoffmonoxid (N_2O) zu elementarem Stickstoff (N_2) durch die Nitrat- (Nar), Nitrit- (Nir), Stickstoffmonoxid- (Nor) und Distickstoffmonoxid-Reduktase (Nos) reduziert. Die Denitrifikation ist abhängig von der Sauerstoff- und Nitratkonzentration in der Umgebung sowie der endogenen Stickstoffmonoxid-Konzentration, sowie von *quorum sensing* Molekülen (Toyofuku *et al.*, 2012). Reguliert wird die Expression der Reduktasegene durch die beiden Fnr (*fumarate and nitrate reductase regulator*)-typ Regulatoren Anr (*anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction*) und Dnr (*dissimilatory nitrate respiration regulator*), welche beide das Fnr-Bindemotiv erkennen (Arai *et al.*, 2003). Anr detektiert Sauerstoff über ein $(4\text{Fe-4S})^{2+}$ -Cluster. Unter aeroben Bedingungen liegt es als Monomer ohne Cluster und unter anaeroben Bedingungen als Dimer mit intaktem Cluster vor (Körner *et al.*, 2003). Letzteres aktiviert die Transkription der Gene *narK₁K₂GHIJ*, *dnr* und *narXL*. Dnr ist ein Stickstoffmonoxidsensor und aktiviert durch Anwesenheit von NO die Transkription der für die Denitrifikation wichtigen Reduktasen. Zusätzlich unterliegt die Regulation des Systems auch dem Zweikomponentensystem NarXL, welches aus der Sensorkinase NarX und dem von ihr

aktivierten Transkriptionsregulator NarL, besteht. NarL aktiviert ebenfalls die Transkription des *nar*-Operons (Arai *et al.*, 2003; Schreiber *et al.*, 2007). In Abbildung 2 ist die Regulation der Denitrifikation in *P. aeruginosa* schematisch dargestellt.

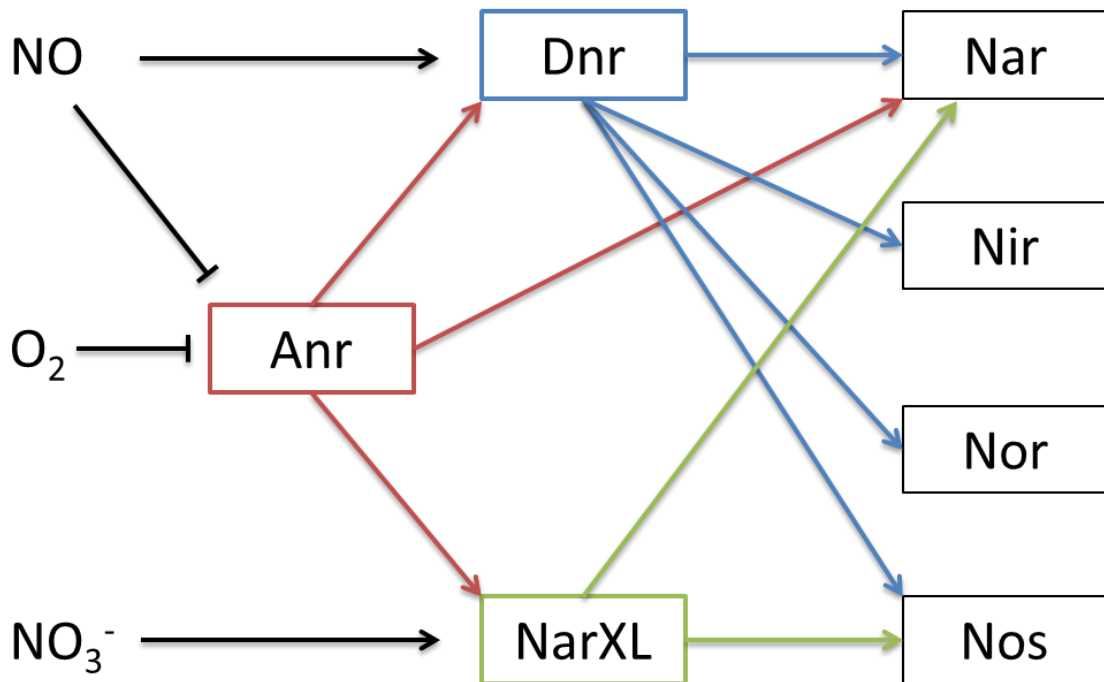


Abbildung 2: Regulation der Denitrifikation (nach Schreiber *et al.*, 2007; Kuroki *et al.*, 2014)

Schematische Darstellung der Regulationskaskade unter anaeroben Bedingungen in *Pseudomonas aeruginosa*. Blaue, rote und grüne Pfeile zeigen eine transkriptionelle Aktivierung durch die mittig dargestellten Regulatoren. Auf der linken Seite sind die Moleküle dargestellt, die von den Regulatoren erkannt werden, was jeweils zur Reprimierung/Aktivierung dieser Regulatoren führt. Auf der rechten Seite sind die vier Reduktasen dargestellt, welche an der Denitrifikation beteiligt sind. Pfeile: Aktivierung, T-Pfeile: Reprimierung

Im ersten Schritt der Denitrifikation wird Nitrat durch die Nitratreduktase (Nar) zu Nitrit reduziert. Die Reduktase ist durch das Operon *narK₁K₂GHIJ* kodiert. Der transmembrane Antiporter (NarK₁K₂) nimmt Nitrat im Austausch gegen Nitrit auf und gibt dieses an den eigentlichen Nitratreduktasekomplex (NarGHI) im Cytoplasma ab (Sharma *et al.*, 2006). Das Transmembranprotein NarI, welches zwei Moleküle Häm *b* enthält, nimmt Elektronen aus dem Quinonpool auf und leitet dieses auf die cytoplasmatische Untereinheit NarH weiter. NarH wiederum überträgt die Elektronen über die enthaltenen [4Fe-4S]-Cluster auf NarG, wo die eigentliche Reduktion von Nitrat zu Nitrit, im Molybdän-Kofaktor enthaltenden aktiven Zentrum, stattfindet (Zumft, 1997). NarJ ist an der Assemblierung der einzelnen Untereinheiten und deren Kofaktoren beteiligt (Lanciano *et al.*, 2007).

Zusätzlich zur cytoplasmatischen Nitratreduktase besitzt *P. aeruginosa* ebenfalls eine periplasmatische Nitratreduktase, welche durch das Operon *napABCDEF* kodiert wird

(Schreiber *et al.*, 2007). Diese liefert allerdings keine Energie, da sie nicht zum Aufbau des Protonengradienten beiträgt (Van Alst *et al.*, 2009).

Nitrit wird im zweiten Schritt der Denitrifikation im Periplasma durch die Cytochrom *cd₁* Nitritreduktase NirS zu Stickstoffmonoxid reduziert. Die NirS wird durch das Operon *nirSMCFDLGHJEN* kodiert (Zumft, 1997). Detailliert wird die Nitritreduktase und das Operon in Kapitel 1.4 beschrieben.

Anschließend wird Stickstoffmonoxid durch die Stickstoffmonoxidreduktase NorBC zu Distickstoffmonoxid umgesetzt. NorBC ist ein integrales Membranprotein, das als Heterodimer vorliegt. Die NorC Untereinheit enthält den Kofaktor Häm *c*, wohingegen die NorB Untereinheit ein Häm *b*, ein Häm *b₃* und ein nicht-Häm Eisen als Kofaktoren beinhaltet. Das Häm *c* der NorC sowie das Häm *b* der NorB sind vermutlich für den Elektronentransport zum aktiven Zentrum zuständig. Im aktiven Zentrum befinden sich das Häm *b₃* und das nicht-Häm Eisen, welche dort an der Umsetzung des Stickstoffmonoxids beteiligt sind (Shiro, 2012).

Im letzten Schritt der Denitrifikation wird Distickstoffmonoxid zu elementarem Stickstoff reduziert. Die Distickstoffmonoxidreduktase NosZ, die im Operon *nosRZDFYL* kodiert ist, liegt als Homodimer im Periplasma vor und enthält jeweils zwei Kupferzentren pro Monomer. NosDFY ist an dem Einbau dieser Kupferzentren beteiligt und NosR ist ein postulierter Regulator für NosZ (Zumft & Kroneck, 2007).

1.4 Das *nir*-Operon in *P. aeruginosa*

Das *nir*-Operon in *P. aeruginosa* besteht aus 11 aufeinander folgenden und sich teilweise überlappenden Genen. Es beinhaltet die Information für die Cytochrom *cd₁* Nitritreduktase NirS, welche während der Denitrifikation Nitrit zu Stickstoffmonoxid reduziert (Kawasaki *et al.*, 1997). Außerdem enthält es die Gene *nirMCFDLGHJEN*, welche als physiologische Elektronendonatoren (NirM & NirC) dienen und an der Biosynthese des spezifischen Kofaktors Häm *d₁* beteiligt sind (Hasegawa *et al.*, 2001; Zajicek *et al.*, 2009; Storbeck *et al.*, 2011). In Abbildung 3 ist die Operonstruktur des *nir*-Operons dargestellt.

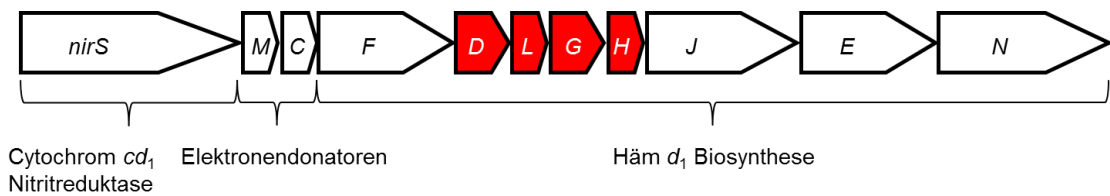


Abbildung 3: Das *nir*-Operon in *P. aeruginosa*.

Gezeigt ist das *nir*-Operon beginnend mit dem Gen der Cytochrom *cd*₁ Nitritreduktase (NirS), die beiden c-typ Cytochrome NirM und NirC, welche als Elektronendonatoren dienen, sowie die Gene für die Proteine NirF bis NirN, welche an der Biosynthese des NirS spezifischen Kofaktors Häm *d*₁ beteiligt sind. Rot markiert sind die Biosynthese-Gene NirDLGH, welche in dieser Arbeit untersucht wurden.

1.4.1 Die Cytochrom *cd*₁ Nitritreduktase

Die Cytochrom *cd*₁ Nitritreduktase liegt im Periplasma von *P. aeruginosa* vor und reduziert Nitrit zu Stickstoffmonoxid während der Denitrifikation. Sie ist ein Homodimer, welches aus zwei ca. 62 kDa großen Monomeren besteht. Jedes Monomer besitzt ein kovalent gebundenes Häm *c* und ein nicht-kovalent gebundenes Häm *d*₁ (Nurizzo *et al.*, 1997). Das kovalente Häm *c* wird über ein CxxCH-Motiv an die N-terminale Domäne der NirS gebunden (Thöny-Meyer, 2002), während das nicht-kovalent gebundene Häm *d*₁ in einem achtfachen β -Faltblattpropeller über ionische Wechselwirkungen koordiniert wird (Nurizzo *et al.*, 1997). Abbildung 4 zeigt die Röntgenkristallstruktur von NirS mit ihren vier Kofaktoren.

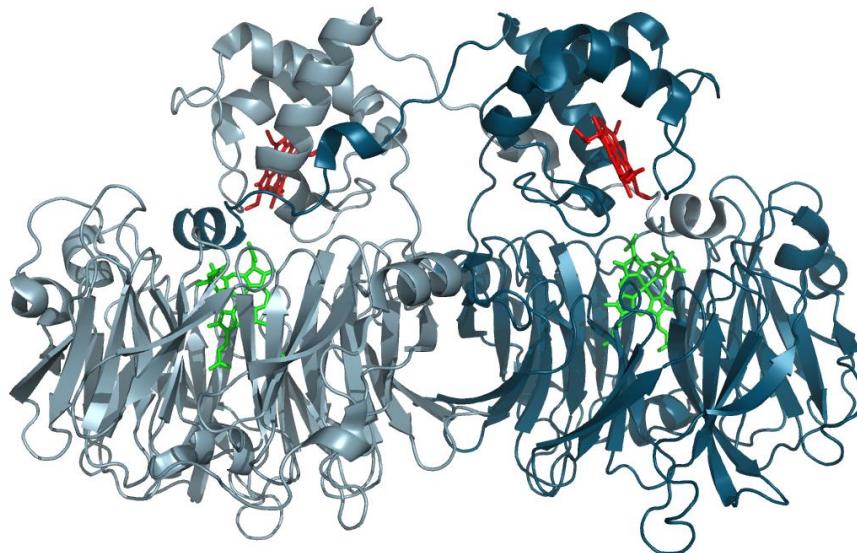


Abbildung 4: Kristallstruktur der Nitritreduktase NirS aus *P. aeruginosa* (Nurizzo *et al.*, 1997)

Dargestellt ist die Röntgenkristallstruktur der Cytochrom *cd*₁ Nitritreduktase NirS. In hellblau und dunkelblau sind die beiden Monomere der NirS zu erkennen. In Rot abgebildet sind die beiden Häm *c* und in Grün die beiden Häm *d*₁ Moleküle. Die Auflösung beträgt 2,15Å.

Die Reduktion des Nitrits findet im aktiven Zentrum am Häm d_1 statt. Dabei wird von einem Elektronendonator ein Elektron auf das Häm c der Nitritreduktase übertragen und dieses an das Häm d_1 weitergegeben. Hier wird Nitrit zu Stickstoffmonoxid reduziert. Häm d_1 enthält ein zentral chelatiertes Eisenatom, welches leicht zu oxidieren ist und aus der Ebene der vier Stickstoffatome heraus ragt. Dies führt zu einer leicht gewölbten Gesamtstruktur des Tetrapyrrols (Barkigia *et al.*, 1992). Durch seine hohe Affinität zu Nitrit und seine deutlich geringere zu Stickstoffmonoxid, dissoziiert das gebildete Stickstoffmonoxid schnell vom Häm d_1 und ein neues Molekül Nitrit kann gebunden werden (Rinaldo *et al.*, 2011).

1.4.2 Die Cytochrome NirM und NirC

Die beiden c -typ Cytochrome NirM und NirC aus *P. aeruginosa* können beide als Elektronendonatoren für die Cytochrom cd_1 Nitritreduktase dienen. Sie sind beide periplasmatisch lokalisiert und besitzen ein CxxCH-Bindemotiv für die Bindung von Häm c (Arai *et al.*, 1990; Hasegawa *et al.*, 2001a). Es konnte gezeigt werden, dass NirM, welches auch als Cytochrom c_{551} bezeichnet wird, einen etwa zehnfach stärkeren Elektronendonator darstellt als NirC (Hasegawa *et al.*, 2001a). Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich bei NirC um den evolutionär älteren Elektronendonator handelt und NirM später dem *nir*-Operon hinzugefügt wurde. Diese Vermutung wird zusätzlich dadurch gestützt, dass nicht in allen denitrifizierenden Bakterien ein *nirM*-Gen zu finden ist (Zajicek *et al.*, 2009).

1.5 Die Tetrapyrrole – Farben des Lebens

Tetrapyrrole sind natürliche Pigmente und werden auch „die Farben des Lebens“ genannt, da sie unter anderem für die rote Farbe des Blutes und das Grün der Blätter verantwortlich sind. Aber wichtiger als die farbgebende Komponente ist die eigentliche Rolle der Tetrapyrrole z.B. beim Elektronentransport oder als prosthetische Gruppe in Enzymen.

Auch die Cytochrom cd_1 Nitritreduktase, welche im Kapitel 1.4.1 beschrieben ist, enthält zwei verschiedene Tetrapyrrole als prosthetische Gruppe: Häm c , das für den Elektronentransport zum aktiven Zentrum und dem zweiten Tetrapyrrol Häm d_1 verantwortlich ist. Häm c ist als Kofaktor in unterschiedlichen Enzymen enthalten, wohingegen Häm d_1 spezifisch für die Cytochrom cd_1 Nitritreduktase ist.

1.5.1 Die Grundstruktur

Die Tetrapyrrole sind aus vier Pyrrolringen aufgebaut, die zirkulär oder linear kovalent durch Methylen- oder Methinbrücken verknüpft sind.

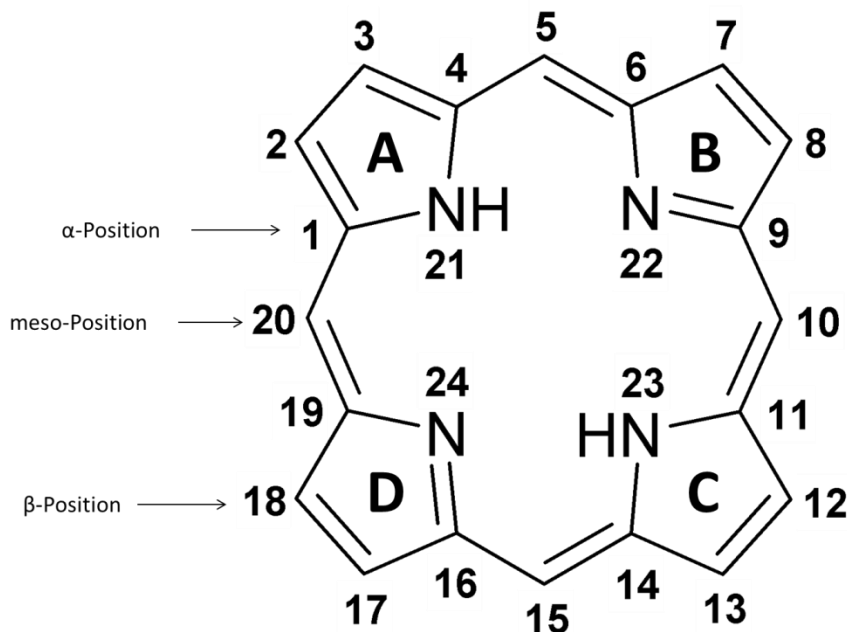


Abbildung 5: Die Grundstruktur aller zirkulären Tetrapyrrole

Die Pyrrolringe sind im Uhrzeigersinn mit A, B, C und D benannt. Alle Kohlenstoffatome sind mit den Zahlen von 1-20 und die vier Stickstoffatome von 21-24 nummeriert. Die α -Position beschreibt Kohlenstoffatome, welche im direkten Kontakt zu Stickstoffatomen stehen, β -Positionen ohne direkte Bindung zu Stickstoffatomen und die meso-Position gibt an, dass die Kohlenstoffatome Teil der Methinbrücken sind.

In Abbildung 5 ist das Porphyrin als Grundstruktur zirkulärer Tetrapyrrole abgebildet. Die einzelnen Pyrrolringe sind im Uhrzeigersinn von A-D benannt. Ebenfalls im Uhrzeigersinn sind die Kohlenstoff- und Stickstoffatome von 1-20 und 21-24 nummeriert. Kohlenstoffatome, die eine direkte Bindung zu einem Stickstoffatom haben, befinden sich in der α -Position und Kohlenstoffatome ohne direkte Bindung in der β -Position. Die Kohlenstoffatome der Methinbrücken befinden sich an der meso-Position. Die Stickstoffatome sind in der Lage verschiedene Metallionen zu komplexieren, wie z.B. Eisen, Magnesium, Cobalt oder Nickel (Jahn *et al.*, 1996).

Die wichtigsten Vertreter der Tetrapyrrole sind Häme, Chlorophylle, Sirohäm, Bacteriochlorophylle, Kofaktor F₄₃₀, Corrinoide und offenkettige Tetrapyrrole. Die einzelnen Vertreter unterscheiden sich in den Oxidationszuständen der Ringsysteme, sowie den möglichen Seitenketten und den chelatierten Metallionen (Heinemann *et al.*, 2008).

1.5.2 Die Biosynthese von Uroporphyrinogen III

Uroporphyrinogen III ist das gemeinsame Vorläufermolekül, aus dem sich die unterschiedlichen Tetrapyrrole ableiten lassen. Bis zu diesem Punkt verläuft die Bildung aller Tetrapyrrole in den unterschiedlichsten Organismen gleich.

Die Synthese von Uroporphyrinogen III startet mit 5-Aminolävulinsäure (ALA). Diese wird in α -Proteobakterien und Säugetieren über den Shemin-Weg, ausgehend von Glycin und Succinyl-CoA, durch die 5-Aminolävulinsäure-Synthase, gebildet (Shemin *et al.*, 1955). Bakterien, Archaeen und Pflanzen bilden ALA mithilfe der Glutamyl-tRNA-Synthetase, der Glutamyl-tRNA-Reduktase und der Glutamat-1-Semialdehyd-2,1-Aminomutase aus Glutamat sowie einer speziellen tRNA^{Glu} (Ilag *et al.*, 1991; Moser *et al.*, 1999). Dieser Weg wurde 1975 von Beale *et al.* entdeckt und wurde aufgrund des Kohlenstoffrückgrades des Glutamats „C₅-Weg“ genannt.

Im Anschluss entsteht, durch asymmetrische Kondensation von zwei ALA-Molekülen, Porphobilinogen (PBG). Diese Reaktion wird durch die Porphobilinogen-Synthase (HemB) katalysiert (Schmid & Shemin, 1955). Im nächsten Schritt werden vier PBG-Moleküle durch die Porphobilinogen-Deaminase (HemC) zu dem instabilen Uroporphyrinogen III-Vorläufer Prä-Uroporphyrinogen verknüpft (Shoolingin-Jordan, 1995). Es kann zu einem spontanen Ringschluss des Prä-Uroporphyrinogens kommen, das dabei entstandene Uroporphyrinogen I ist toxisch und kann nicht weiter umgesetzt werden (Frankenberg *et al.*, 2003). Bei der Synthese von Prä-Uroporphyrinogen zu Uroporphyrinogen III durch die Uroporphyrinogen III-Synthase (HemD), kommt es vor dem Ringschluss des Tetrapyrrols zu einer Inversion des D-Ringes (Silva & Ramos, 2008). Die Uroporphyrinogen III-Biosynthese und die Drehung des D-Ringes sind in Abbildung 6 dargestellt.

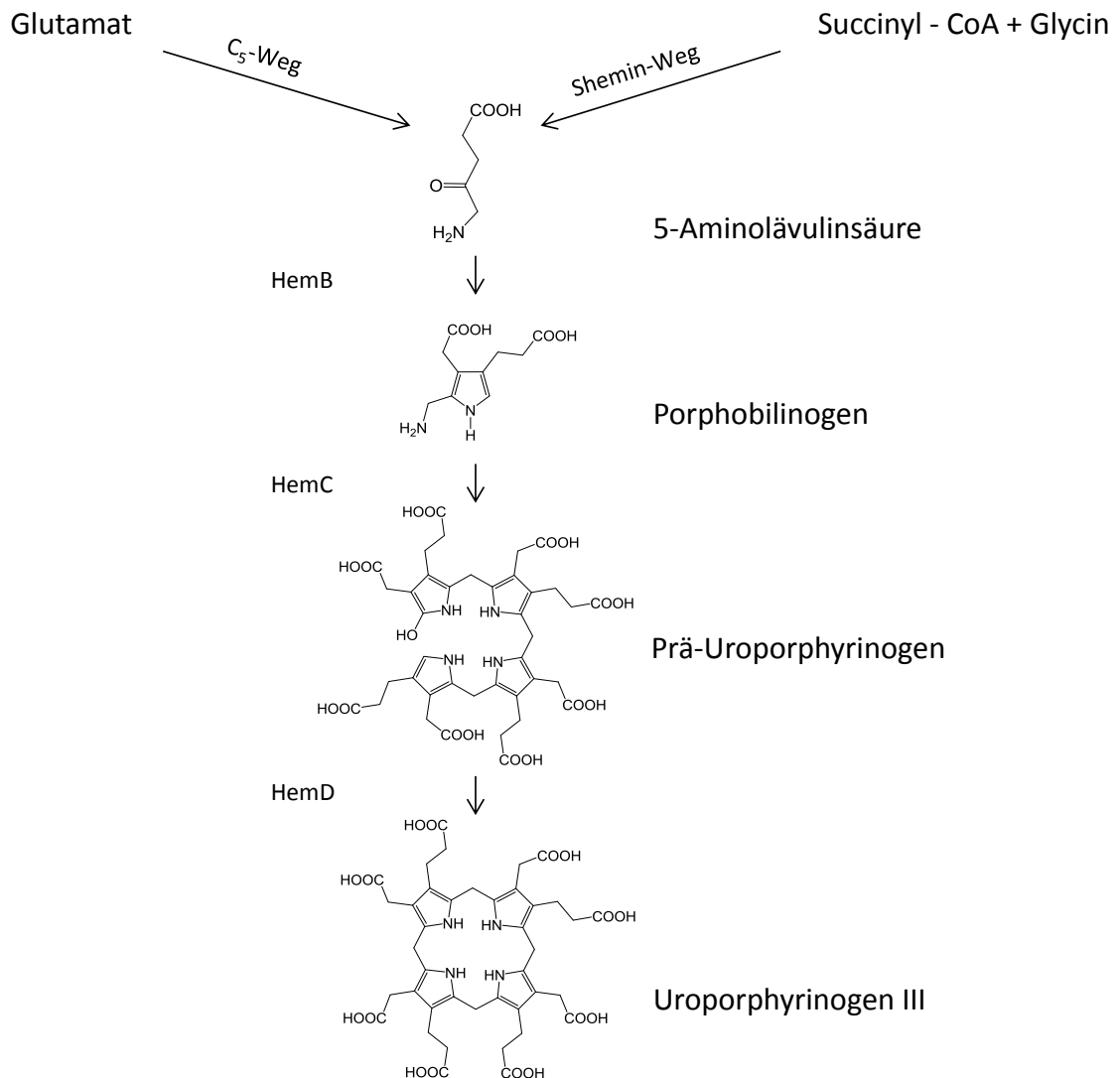


Abbildung 6: Die Uroporphyrinogen III-Biosynthese (nach Layer *et al.*, 2010)

5-Aminolävulinic acid (ALA) kann über den Shemin- oder den C_5 -Weg gebildet werden. Im Folgenden werden zwei Moleküle ALA mithilfe des Enzyms HemB zu einem Molekül Porphobilinogen (PBG) verknüpft. Worauf die Reaktion von 4 PBG-Molekülen zu Prä-Uroporphyrinogen durch HemC katalysiert wird. Im letzten Schritt der Biosynthese invertiert das Enzym HemD den D-Ring und schließt den Ringkomplex des Tetrapyrrols, sodass Uroporphyrinogen III entsteht.

Das entstandene Uroporphyrinogen III dient als Verzweigungspunkt für die verschiedenen Biosynthesewege der Tetrapyrrole. Sirohäm, Häm d_1 und der Kofaktor F_{430} werden über das Intermediat Precorrin-2, sowie Häm und Chlorophyll über die Intermediate Coproporphyrinogen III und Protoporphyrin IX gebildet (Layer *et al.*, 2010).

1.5.3 Die Häm d_1 -Biosynthese

Wie bereits in Kapitel 1.4.1 beschrieben, ist Häm d_1 einer der zwei Kofaktoren der Cytochrom cd_1 Nitritreduktase. Dieser Kofaktor ist spezifisch und kommt nur in der Nitritreduktase vor.

Die Häm d_1 -Biosynthese verläuft wie bei allen Tetrapyrrolen von ALA über Porphobilinogen und Prä-Uroporphyrinogen zu Uroporphyrinogen III (siehe Kapitel 1.5.2). Ab diesem Zwischenprodukt spalten sich die einzelnen Biosynthesewege auf. In der Synthese von Häm d_1 werden zunächst zwei Methylgruppen an die Kohlenstoffatomen C2 und C7 durch die Methyltransferase NirE hinzugefügt (Storbeck *et al.*, 2011). Das so entstandene Precorrin-2 wird durch bislang unbekannte Enzyme über Sirohydrochlorin zu Sirohäm umgesetzt. Dabei wird als Erstes eine Doppelbindung zwischen den Ringkohlenstoffatomen C14 und C15 und im Anschluss das zentrale Eisenatom eingebaut.

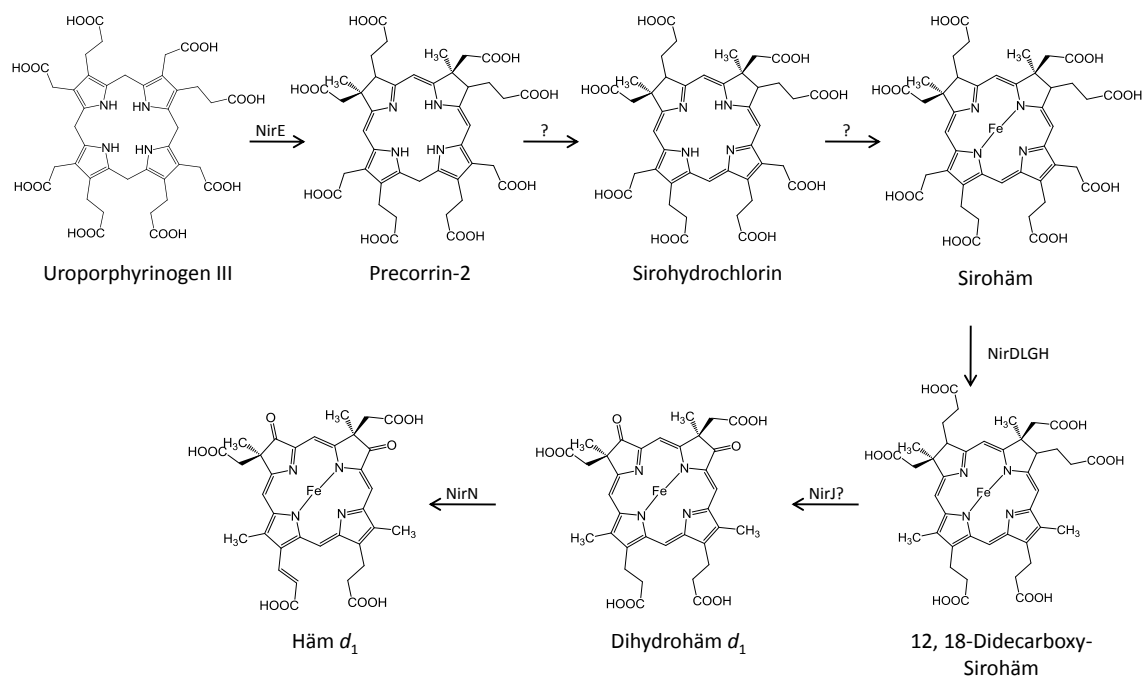


Abbildung 7: Die Biosynthese von Häm d_1 (nach Bali *et al.*, 2011; Adamczack *et al.*, 2014).

Im ersten Schritt wird Uroporphyrinogen III, unter Addition von zwei Methylgruppen, durch NirE zu Precorrin-2 umgewandelt. Darauf folgend werden sowohl eine Doppelbindung in das Ringsystem, als auch das zentrale Eisenatom durch unbekannte Enzyme eingebaut. Anschließend decarboxyliert der Enzymkomplex NirDLGH Sirohäm zu 12,18-Didecarboxy-Sirohäm. Für die Abspaltung der Propionatseitenketten und die Addition der beiden Ketogruppen zu Dihydrohäm d_1 ist vermutlich NirJ verantwortlich. Im letzten Biosyntheseschritt fügt NirN eine zusätzliche Doppelbindung in die Propionatseitenkette am C17-Atom ein.

Im nächsten Schritt werden die Acetatgruppen an Position C12 und C18 des Sirohäms durch den Proteinkomplex NirDLGH decarboxyliert (Bali *et al.*, 2011). Dabei entsteht

12,18-Didecarboxy-Sirohäm, das im Anschluss vermutlich durch NirJ zu Dihydrohäm d_1 umgewandelt wird. Hierbei werden zwei Propionatseitenketten an den C3- und C8-Atomen abgespalten und zwei Ketogruppen an selber Stelle eingefügt (Brindley *et al.*, 2010). Im letzten Biosyntheseschritt wird eine zusätzliche Doppelbindung in der Propionatseitenkette an C17 mithilfe des Enzyms NirN eingebaut (Adamczack *et al.*, 2014). Abbildung 7 zeigt die einzelnen Syntheseschritte von Uroporphyrinogen III zu dem Kofaktor Häm d_1 mit den dazugehörigen Enzymen, die die Reaktion katalysieren. Wie das Intermediat während der Synthese vom Cytoplasma ins Periplasma geschleust und im Anschluss an die abgeschlossene Synthese, der Kofaktor in die Nitritreduktase eingebaut wird, ist bislang nicht bekannt.

1.6 Die Häm d_1 -Biosyntheseenzyme

Wie bereits in Kapitel 1.4.1 beschrieben, besitzt die Cytochrom cd_1 Nitritreduktase aus *P. aeruginosa* unter anderem einen für sie spezifischen Kofaktor – das Häm d_1 . Im Folgenden werden die einzelnen Biosyntheseenzyme, die an der Bildung des NirS-spezifischen Kofaktors Häm d_1 beteiligt sind, genauer beschrieben.

1.6.1 Die Methyltransferase NirE

Wie bereits zu Beginn des Kapitels 1.4 erwähnt, enthält das *nir*-Operon neben den Genen für die Nitritreduktase und den Elektronendonatoren ebenfalls die Gene für die Biosyntheseenzyme des NirS-spezifischen Kofaktors Häm d_1 . Dazu gehört auch NirE, das im Jahr 2009 von Storbeck *et al.* als *S*-Adenosyl-L-Methionin (SAM)-abhängige Uroporphyrinogen III Methyltransferase (SUMT) charakterisiert wurde. NirE liegt als Homodimer vor und katalysiert die Umsetzung von Uroporphyrinogen III zu Precorrin 2. Dabei wird je eine Methylgruppe auf die Position C2 und C7 des Uroporphyrinogen III übertragen. Als Donor für die Methylgruppen dient das SAM, welches bei der Reaktion zu *S*-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) umgesetzt wird. In Abbildung 8 ist die Röntgenkristallstruktur von NirE zusammen mit dem Substrat sowie SAH abgebildet, welche 2011 von Storbeck *et al.* gelöst werden konnte.

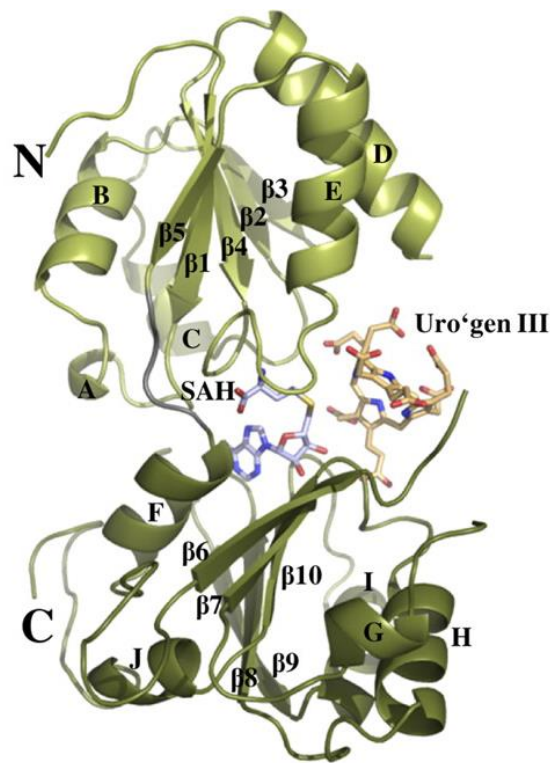


Abbildung 8: Kristallstruktur von NirE im Komplex mit Substrat und SAH (Storbeck *et al.*, 2011)
Gezeigt ist die Röntgenkristallstruktur eines Monomers der dimeren SAM-abhängigen Uroporphyrinogen III Methyltransferase NirE im Komplex mit ihrem Substrat Uroporphyrinogen III (Uro'gen III) und dem S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH). In hell- und dunkelgrün sind die beiden Domänen des Monomers dargestellt, die α -Helices sind alphabetisch und die β -Faltblätter numerisch gekennzeichnet. Die Struktur wurde mit einer Auflösung von 2,0 Å bestimmt.

1.6.2 Das Eisen-Schwefel-Protein NirJ

Bei NirJ handelt es sich um ein cytoplasmatisches Protein, mit einem Molekulargewicht von circa 44 kDa (Kawasaki *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass NirJ ein N-terminales Cysteinmotiv CxxxCxxC enthält, dessen Cysteinreste bei NirJ aus *Pa. pantotrophus* ein [4Fe-4S]-Cluster koordinieren (Brindley *et al.*, 2010). Diese Art der Fe-S-Cluster sind charakteristisch für die Gruppe der *Radical-SAM* Enzyme, welche durch Bildung eines Adenosylradikals aufwendige chemische Reaktionen katalysieren (Layer *et al.*, 2004). Weitere Sequenzhomologien zu anderen *Radical-SAM* Enzymen, die noch ein zweites Fe-S-Cluster am C-Terminus aufweisen, konnten experimentell durch ESR-Untersuchungen nicht bestätigt werden (Brindley *et al.*, 2010). Es wird postuliert, dass NirJ an der Häm d_1 Biosynthese beteiligt ist und dort den Schritt von 12,18-Didecarboxy-Sirohäm zu 3,8-Dioxo-12,18-Didecarboxy-Siroheme (Dihydrohäm d_1) katalysiert (Bali *et al.*, 2014). Gezeigt werden konnte bislang die Abspaltung einer oder beider Propionatseitenketten am C3- und C8-Atom, jedoch keine Einführung der beiden Ketogruppen (pers. Mitteilung Linda Boß, 2015).

1.6.3 Das Lipoprotein NirF

Das Protein NirF aus *P. aeruginosa* wurde lange Zeit als cytoplasmatisches Protein annotiert. Durch bioinformatische Untersuchungen im Jahre 2010 stellten Remans *et al.* die Hypothese auf, dass es sich bei NirF in *P. aeruginosa* um ein membranständiges Lipoprotein handelt und aufgrund seiner Sortierungssequenz vermutlich auf der periplasmatischen Seite der Inneren Membran verankert ist. Dies konnte experimentell von Nicke *et al.* 2013 bestätigt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass NirF mit NirS und NirN im Periplasma interagiert, wobei die Interaktion von NirS mit NirN abhängig von der Anwesenheit von NirF ist (Nicke *et al.*, 2013). Welche genaue Rolle NirF in der Häm d_1 -Biosynthese spielt, konnte bislang nicht gezeigt werden. Allerdings lassen die bisher gewonnenen Ergebnisse die Annahme zu, dass ein Vorläufer des Häm d_1 durch einen bislang unbekannten Transporter ins Periplasma geschleust und dort von NirF übernommen wird. Durch die Interaktion von NirF, NirN und NirS könnte die Biosynthese des Häm d_1 abgeschlossen werden und der Einbau in die NirS erfolgen (Tristan Nicke, 2013). Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass NirF *in vitro* in der Lage ist, Dihydrohäm d_1 zu binden, allerdings nicht an der Katalyse von Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 beteiligt ist (Adamczack *et al.*, 2014)

1.6.4 Die periplasmatische Dehydrogenase NirN

NirN ist ein ca. 54 kDa großes Protein, welches durch das Sec-Transportsystem ins Periplasma geschleust wird. Es weist eine 24%ige Aminosäuresequenz-Identität zur NirS auf und enthält ebenso wie die NirS ein CxxCH-Motiv, welches für die Bindung von Häm c zuständig ist (Hasegawa *et al.*, 2001a). Für NirN aus *Pa. pantotrophus* konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* in der Lage ist Häm d_1 zu binden und auf die Nitritreduktase zu übertragen (Zajicek *et al.*, 2009). Bereits 1997 haben Kawasaki *et al.* festgestellt, dass eine NirN Deletion in *P. aeruginosa* nur einen schwach verlangsamten Wachstumsphänotyp unter anaeroben Bedingungen zeigt. Ebenso wurde nur eine reduzierte Nitritreduktaseaktivität von 57 % nachgewiesen. Nicke *et al.* konnte im Jahr 2013 eine Interaktion zwischen NirN und NirS *in vivo* belegen, welche abhängig von NirF ist. Zusätzlich wies die gereinigte NirS aus der NirN-Deletionsmutante kein typisches Holo-NirS-Absorptionsspektrum auf. Dies lässt die Vermutung zu, dass NirN zwar an der Insertion des Kofaktors in die NirS beteiligt ist, darüber hinaus aber auch eine Rolle in der Biosynthese des Kofaktors spielen könnte.

Diese Vermutung wurde im Anschluss bestätigt, indem gezeigt wurde, dass die gereinigte NirS aus der NirN-Deletionsmutante den Vorläufer Dihydrohäm d_1 enthält. Des Weiteren wurde belegt, dass NirN *in vitro* die Reaktion von Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 katalysiert. Dabei wird eine Doppelbindung in die Propionatseitenkette am C17-Atom eingefügt. (Adamczack *et al.*, 2014)

1.6.5 Die Sirohäm-Decarboxylase NirDLGH

Bei NirDLGH aus *P. aeruginosa* handelt es sich um vier einzelne cytoplasmatische Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 17 und 20 kDa. NirD und NirG weisen eine Aminosäuresequenz-Identität von 42 % und NirL und NirH von 35 % auf. Durch Koreinigungsexperimente konnte gezeigt werden, dass NirD und NirL sowie NirG und NirH stabile Komplexe bilden (Johannes Walther, 2011). Außerdem kommt es in den denitrifizierenden Bakterien *Paracoccus denitrificans*, *Dinoroseobacter shibae* und *Hydrogenobacter thermophilus* (*H. thermophilus*) zur Bildung des Fusionsproteins NirDL. Aufgrund der hohen Affinität zueinander und des Auftretens der Fusionsproteine wird vermutet, dass NirDLGH aus *P. aeruginosa* einen heterotetrameren Komplex ausbildet, der für die Decarboxylierung der Acetatseitenketten von Sirohäm am C12- und C18-Atom zuständig ist. Für NirDLGH aus *Pa. pantotrophus* konnte gezeigt werden, dass der Proteinkomplex *in vitro* die Umsetzung von Sirohäm zu 12,18-Didecarboxy-Sirohäm über ein Intermediat (Monodecarboxy-Sirohäm) katalysiert (Bali *et al.*, 2011).

Zusätzlich zu der beschriebenen enzymatischen Aktivität von NirDLGH, sind die Proteine aufgrund von Sequenzhomologien als Transkriptionsregulatoren annotiert und werden in die Familie der Lrp/AsnC-Regulatoren einsortiert (Winsor *et al.*, 2011). Der Name der Familie leitet sich dabei von den *E. coli*-Regulatoren AsnC (asparagine synthase C) und Lrp (leucine-responsive regulatory protein) ab. Die Familie dieser Transkriptionsregulatoren umfasst Proteine aus Bakterien und Archaeen, die sowohl aktivierende als auch reprimierende Wirkung auf das Zielgen haben können. Ferner können sie sehr spezifische oder globale Stoffwechselwege regulieren. Häufig dient eine Aminosäure als Effektormolekül. Besonders charakteristisch ist das ausgeprägte Helix-Turn-Helix-Motiv, das für die Bindung an die DNA notwendig ist (Thaw *et al.*, 2006). Ein solches Motiv ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

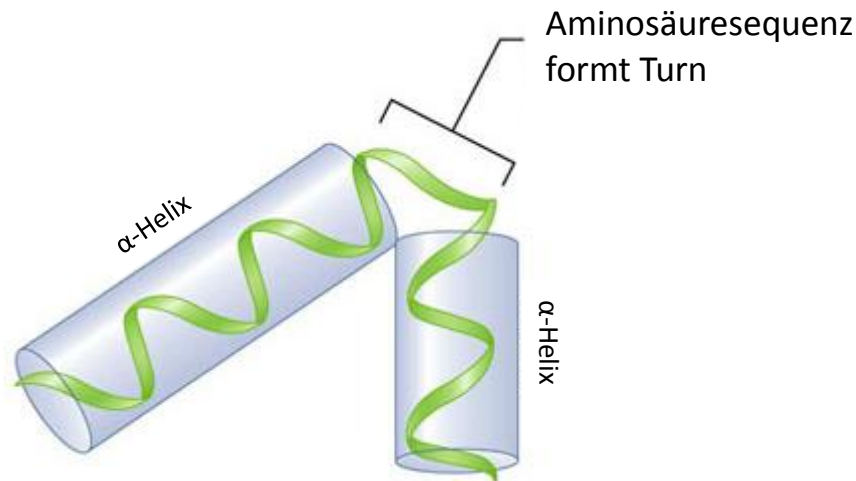


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Helix-Turn-Helix-Motivs (nach Aravind *et al.*, 2005)
Die Abbildung zeigt zwei α -Helices, die durch einen Turn in der Aminosäuresequenz verbunden sind. In grün ist das Aminosäurerückgrat und in blau die vereinfachte Struktur zweier α -Helices dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass NirDL und NirGH aus *P. aeruginosa* an die DNA *upstream* des *nirJ*-Gens binden. Dort befindet sich ein weiterer Transkriptionsstartpunkt im *nir*-Operon (Johannes Walther, 2011). Der potentielle Promotorbereich ist in Abbildung 10 dargestellt.

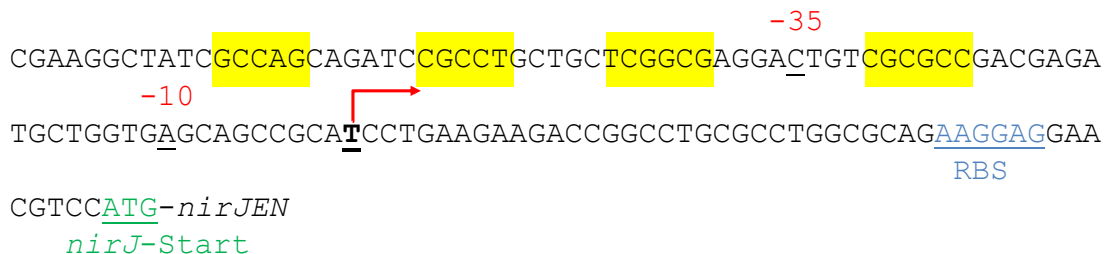


Abbildung 10: Der potentielle Promotorbereich *upstream* von *nirJ* aus *P. aeruginosa* (nach Johannes Walther, 2011)

Dargestellt sind 130 bp *upstream* des *nirJ*-Gens von *P. aeruginosa*. Durch Primer-Extension-Analysen konnte ein zusätzlicher Transkriptionsstartpunkt identifiziert werden. Dieser ist fett gedruckt, unterstrichen und mit einem Pfeil versehen. Die -10 und -35 Regionen sind ebenfalls unterstrichen und markiert. Die Ribosomenbindestelle ist blau und das Startcodon von *nirJ* grün dargestellt. Die durch DNA-Protektionsanalysen postulierten NirDLGH-Bindestellen sind gelb hervorgehoben.

Welchen Einfluss die Bindung auf die Expression der nachfolgenden Gene *nirJEN* hat und ob es dadurch zur Aktivierung oder Repression kommt, konnte bislang nicht gezeigt werden. Ebenso ist eine Beteiligung eines Effektormoleküls ungeklärt.

2. Zielsetzung

Das Ziel dieser Dissertation war die Aufklärung der Funktion der Proteine NirDLGH aus *P. aeruginosa* und die Charakterisierung dieser.

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass NirDLGH aus *Pa. pantotrophus* die Reaktion von Sirohäm, über das Intermediat Monodecarboxy-Sirohäm, zu 12,18-Didecarboxy-Sirohäm *in vitro* katalysiert (Bali *et al.*, 2011). Auf dieser Grundlage sollte sowohl ein *in vivo*-Test als auch *in vitro*-Enzymaktivitätstest etabliert werden, der die Aktivität von NirDLGH aus *P. aeruginosa* qualitativ als auch quantitativ nachweist. Des Weiteren sollte gezeigt werden, welches Substrat die Heterodimere NirDL und NirGH bevorzugt umsetzen.

Da NirDLGH zusätzlich zu der enzymatischen Aktivität, eine Aktivität als Transkriptionsregulator ausweist (Johannes Walther, 2011), sollte diese Aktivität mithilfe von Reportergenkonstrukten in *P. aeruginosa* tiefergehend untersucht werden. Hierzu sollten unter Anderem verschiedene *nirDLGH*-Deletionsmutanten eingesetzt werden.

Außerdem war die Kristallisation des NirDLGH-Homologons NirDL aus *H. thermophilus* ein wichtiger Punkt während dieser Dissertation, um die eigentliche Struktur des Proteinkomplexes aufzuklären. Hierbei sollte die Struktur ohne und mit Substrat gelöst werden, um eine Aussage über Konformationsänderungen, Lage des Substrats und Abstände einzelner Aminosäuren zum Substrat zu treffen.

Aufgrund der Strukturanalyse sollten geeignete Aminosäuren für die Austauschstudien ausgewählt und diese untersucht werden, damit der genaue Reaktionsmechanismus aufgeklärt werden kann.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 1: Geräteliste

Gerät	Modell	Hersteller
<i>Agarosegelelektrophorese-Apparatur</i>	Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad
<i>Äkta</i>	Purifier UV-900	GE Healthcare Ltd.
<i>- Säule</i>	10/300 Superdex 75	
<i>Anaerobenzelt</i>		Coy Laboratory
<i>Autoklav</i>	FVA3/A1	Fedegari Autoklaven AG
<i>Disruptor</i>	Disruptor Genie	Scientific Industries
<i>Elektroporation</i>	Genepulser II mit Pulse Controller Plus	Bio-Rad
<i>French Press</i>	French PressureCell Press	Thermo Fisher Scientific
<i>Geldokumentationsanlage</i>	UV Transilluminator	Wealtec Europe
	Dark Hood DH-50	biostep GmbH
<i>HPLC</i>	JASCO 2000-HPLC	JASCO
<i>- Detektoren</i>	MD-2015Plus FP-2020Plus	
<i>- Pumpe</i>	PU-2080Plus	
<i>- Autosampler</i>	AS-2055	
<i>- Gradientenmischer</i>	LG-2080-04	
<i>- Entgaser</i>	DG 2080-54	
<i>- Säule</i>	ReproSil-Pur C18-AQ, 5 µm (250x4,6 mm) Equisil BDS C18-2, 5 µm, (250 x 4,6 mm)	Dr.Maisch
<i>Magnetrührer</i>	Combimag	IKA
<i>Nano-Drop</i>	ND-100 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH
<i>pH-Meter</i>	SevenEasy	Mettler-Toledo
<i>Photometer</i>	Ultrospec 2100 pro	GE Healthcare
<i>Reinstwasseranlage</i>	Milli-Q Synthesis A 10	Millipore
<i>Rollentaumelmischgerät</i>	RS-TR05	Phoenix Instrument
<i>Röntgenfilmentwickler</i>	Optimax Typ TR	MS-Laborgeräte GmbH

<i>SDS-PAGE-Apparatur</i>	Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad
	PowerPack Basic	Bio-Rad
<i>Semidry-Blot</i>	Trans-Blot®SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad
	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad
<i>Konzentrator</i>	Concentrator plus	Eppendorf
<i>Thermocycler</i>	MyCycler	Bio-Rad
<i>Thermomixer</i>	Thermomixer 5436	Eppendorf
	Compact	Eppendorf
	ThermoStat plus	Eppendorf
<i>Ultraschallbad</i>	Ultraschallbad eurolab	Merck
<i>UV Crosslinker</i>	UV Stratalinker 2400	Stratagene
<i>UV/Vis-Spektrometer</i>	V-650 Spectrophotometer	JASCO
<i>Vortexer</i>	Vortex Genie 2	Scientific Industries
<i>Waagen</i>	Talent TE1502S	Sartorius
	Talent TE124S	Sartorius
<i>Wasserbadschüttler</i>	HT Aquatron	Infors AG
<i>Zentrifugen</i>	5415 D	Eppendorf
	5424 R	Eppendorf
	Megafuge 1.0 R	Heraeus
	Avanti™ J-26 XP	BeckmanCoulter
	Avanti™ J-30I	BeckmanCoulter

3.2 Chemikalien

Die, für diese Arbeit, verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Enzyme stammten alle, wenn nicht anders angegeben, von den folgenden Firmen: Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Macherey-Nagel (Düren, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Thermo Scientific (St. Leon Roth, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland),

3.3 Kommerzielle Kits und Oligonukleotide

3.3.1 Kommerzielle Kits

CDP-Star	Roche
DIG Gel Shift Kit	Roche
QIAquick®PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAquick®Gel Extraction Kit	QIAGEN
QuikChange II Site-directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
Q5 Site-directed Mutagenesis Kit	NEB

3.3.2 Oligonukleotide

Die nachfolgende Tabelle 2 enthält die, für Klonierungen und Mutagenesen, verwendeten Oligonukleotide. Diese wurden von der Firma metabion international AG (Martinsried, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Verwendungszweck
oJW5-FW	5' -GCGGAGATCGAAGGCTATCGCCAGCAGAT CCGCCTGCTGCTCGGCGAGGACTGTCGCGC CGACGA-3'	Enzymaktivität
oJW5-BW	5' -TCGTCGGCGCGACAGTCCCTCGCCGAGCAGC AGGCGGATCTGCTGGCGATAGCCTTCGATC TCCGC-3'	Enzymaktivität
oKH18	5' -GGTGTCTAGC GCG AACTACGAGCGG-3'	H93A ^{*1} fw
oKH19	5' -CCGCTCGTAGTT CGC GCTGACACC-3'	H93A ^{*1} rev
oKH20	5' -GGTGTCTAGC TCT AACTACGAGCGG-3'	H93S ^{*1} fw
oKH21	5' -CCGCTCGTAGTT AGA GCTGACACC-3'	H93S ^{*1} rev
oKH22	5' -GGTGTCTTCC GCG TGCTATCAGAGG-3'	H261A ^{*1} fw
oKH23	5' -CCTCTGATAGCA CGC GGAAACACC-3'	H261A ^{*1} rev
oKH24	5' -GGTGTCTTCC TCT TGCTATCAGAGG-3'	H261S ^{*1} fw
oKH25	5' -CCTCTGATAGCA AGA GGAAACACC-3'	H261S ^{*1} rev
oKH30	5' -AGCCACAAC CTG GAGCGGAC-3'	Y95L ^{*1} fw
oKH31	5' -GTCCGCTC CAG GTGTGGCT-3'	Y95L ^{*1} rev
oKH44	5' -CCCACTGC TTT CAGAGGACAAC-3'	Y263F ^{*1} fw
oKH45	5' -GTTGTCCTCTG AAA GCAGTGGG-3'	Y263F ^{*1} rev
oKH46	5' -CCCACTGC GCG CAGAGGACAAC-3'	Y263A ^{*1} fw
oKH47	5' -GTTGTCCTCTG CGC GCAGTGGG-3'	Y263A ^{*1} rev

oKH54	5´-GGTGTCTAGCC CAG AACTACGAGCGG-3´	H93Q ^{*1} fw
oKH55	5´-CCGCTCGTAGTT CTG GCTGACACC-3´	H93Q ^{*1} rev
oKH56	5´-GGAGTACTA AAG AGAATTTCCGCG-3´	R218K ^{*1} fw
oKH57	5´-CGCGGAAATTCT CTT TAGTACTCC-3´	R218K ^{*1} rev
oKH58	5´-GGAGTACTA CAG AGAATTTCCGCG-3´	R218Q ^{*1} fw
oKH59	5´-CGCGGAAATTCT CTG TAGTACTCC-3´	R218Q ^{*1} rev
oKH60	5´-GGAGTACTA GCG AGAATTTCCGCG-3´	R218A ^{*1} fw
oKH61	5´-CGCGGAAATTCT CGC TAGTACTCC-3´	R218K ^{*1} rev
oKH62	5´-GGAGTACTAAGG AAG ATTTCCGCG-3´	R219K ^{*1} fw
oKH63	5´-CGCGGAAAT CTT CCTTAGTACTCC-3´	R219K ^{*1} rev
oKH64	5´-GGAGTACTAAGG CAG ATTTCCGCG-3´	R219Q ^{*1} fw
oKH65	5´-CGCGGAAAT CTG CCCTTAGTACTCC-3´	R219Q ^{*1} rev
oKH66	5´-GGAGTACTAAGG GCG ATTTCCGCG-3´	R219A ^{*1} fw
oKH67	5´-CGCGGAAAT CGC CCCTTAGTACTCC-3´	R219A ^{*1} rev
oKH68	5´-GGTACTTTAC CAG AGAAGAGCGG-3´	H226Q ^{*1} fw
oKH69	5´-CCGCTCTTCT CTG GTAAAGTACC-3´	H226Q ^{*1} rev
oKH70	5´-GGTACTTTAC GCG AGAAGAGCGG-3´	H226A ^{*1} fw
oKH71	5´-CCGCTCTTCT CGC GTAAAGTACC-3´	H226A ^{*1} rev
oKH72	5´-CCTGGTTTTTAAGAGTAGTA AA ACTC TTTAAGATAGGTGTGAAGC-3´	R139K ^{*1} fw
oKH73	5´-GCTTCACACCTATCTTAAAGAG TTT T ACTACTCTTAAAACCAGG-3´	R139K ^{*1} rev
oKH74	5´-CCTGGTTTTTAAGAGTAGTA GCG CTC TTTAAGATAGGTGTGAAGC-3´	R139A ^{*1} fw
oKH75	5´-GCTTCACACCTATCTTAAAGAG CGC T ACTACTCTTAAAACCAGG-3´	R139A ^{*1} rev
oKH76	5´-CA CTCGAG ACAACCTGTTCCGCATG-3´	pJW4 ^{*2} klonieren fw
oKH77	5´-CG GAATTC GGACGTTCCCTCCTTCTG-3´	pJW4 ^{*2} klonieren rev
oKH78	5´-GCCACAACCTACGAG AAA ACGC ATGACTTTAATCTGTGG-3´	R97K ^{*1} fw
oKH79	5´-CCACAGATTAAAGTCATGCGT TTT C TCGTAGTTGTGGC-3´	R97K ^{*1} rev
oKH80	5´-GCCACAACCTACGAG GCG ACGCAT GACTTTAATCTGTGG-3´	R97A ^{*1} fw

oKH81	5´-CCACAGATTAAAGTCATGCGT CGC CTCGTAGTTGTGGC-3´	R97A ^{*1} rev
oKH82	5´-CCCACTGCTATCAG AAA ACAAC TTCCGAAAAGTTCAGG-3´	R265K ^{*1} fw
oKH83	5´-CCTGAACTTTTCGGAAGTTGT TTT CTGATAGCAGTGGG-3´	R265K ^{*1} rev
oKH84	5´-CCCACTGCTATCAG GCG ACAAC TTCCGAAAAGTTCAGG-3´	R265A ^{*1} fw
oKH85	5´-CCTGAACTTTTCGGAAGTTGT CGC CTGATAGCAGTGGG-3´	R265A ^{*1} rev
oKH86	5´-GCACAAGGGAGTTCAA ACAGG TC AGGATAAAGTACTTTTCTG-3´	K314Q ^{*1} fw
oKH87	5´-CAGAAAAGTACTTTATCCTGAC CTG TTTGAACCTCCCTTGTGC-3´	K314Q ^{*1} rev
oKH88	5´-GGTGTTTCC CTG TGCTATCAGAGG-3´	H261L ^{*1} fw
oKH89	5´-CCTCTGATAGCA CAG GAAACACC-3´	H261L ^{*1} rev
oKH90	5´-CTGCTATCAG AAA ACAACCTCCGAAAAG-3´	R265K ^{*1} fw
oKH91	5´-TGGGAAACACCTTTAAAGC-3´	R265K/A rev
oKH92	5´-CTGCTATCAG GCG ACAACCTCCGAAAAG-3´	R265A ^{*1} fw
oKH93	5´-AGGTGTTTCC CTG TGCTATCAGAGG-3´	H261L ^{*1} fw
oKH94	5´-TTAAAGCCTGCTATGTATC-3´	H261L rev
oNB51	5´-CTCAGCCCGAAGCCGGTGTT-3´	Mating fw
oNB53	5´-GAAATCCGGCTGTTGCCCTG-3´	Mating rev

^{*1} Die mutierten Basen sind **hervorgehoben**

^{*2} Die Restriktionsschnittstelle ist **hervorgehoben**

3.4 Bakterienstämme und Plasmide

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Bakterienstämme und Plasmide aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
BL21 (DE3)-RIL	<i>B F⁻ ompT hsdS (rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tet^r galλ (DE3) endA Hte</i>	Stratagene
DH10B	<i>F⁻ mcrA D(mrr⁻ hsdRMS⁻ mcrBC) f80d lacZDM15 D lacX74 deoR recA1 araD139 D (ara, leu)7697 galUgalKrrsL endA1 nupG</i>	Gibco Life Technologies
ST18	<i>pro thi hsdR⁺ Tp^r Sm^r; chromosome::RP4-2 Tc::Mu-Kan::Tn7/λpir ΔhemA</i>	Thoma & Schobert, 2009
XL10 gold	<i>TetrΔ(mcrA)183Δ(mcrCB⁻ hsdSMR⁻ mrr)173 endA1 supE44 thi⁻1 gyrA96 relA1 lacHte [F[']proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tet^r) Amy Camr]</i>	Stratagene
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Wildtyp	Dunn & Holloway, 1971
KS11	chromosomale Reporterengenfusion mit mini-CTX-lacZ (leer) attB::mini-CTX-lacZ	Schreiber <i>et al.</i> , 2006
PAO1JW0	PAO1 attB::mini-CTX-lacZ	Walther, 2011
PAO1JW4	PAO1 attB::mini-CTX-lacZ mit -124 bp bis +42 bp upstream nirJ	Walther, 2011
PAO1JW6	PAO1 attB::mini-CTX-lacZ mit -64 bp bis +14 bp upstream nirJ, Mutation in NirDLGH-Binderegion	Diese Arbeit
PAO1JW9	PAO1 attB::mini-CTX-lacZ mit -124 bp bis +14 bp upstream nirJ	Diese Arbeit
PAO1JW10	PAO1 attB::mini-CTX-lacZ mit -64 bp bis +14 bp upstream nirJ	Diese Arbeit
PAO1JW4 + pUCP20TnirL	PAO1 attB::mini-CTX-lacZ mit -124 bp bis +42 bp upstream nirJ + pUCP20TnirL, Carb ^R	Diese Arbeit

PAO1JW4 + pUCP20 <i>TnirH</i>	PAO1 <i>attB</i> ::mini-CTX- <i>lacZ</i> mit -124 bp bis +42 bp upstream <i>nirJ</i> + pUCP20 <i>TnirH</i> , Carb ^R	Diese Arbeit
PAO1Δ <i>nirL</i> JW4	PAO1Δ <i>nirL</i> #47325, <i>attB</i> ::mini-CTX- <i>lacZ</i> mit -124 bp bis +42 bp upstream <i>nirJ</i>	Kohn, 2013
PAO1Δ <i>nirL</i> JW4 + pUCP20 <i>TnirL</i>	PAO1Δ <i>nirL</i> #47325, <i>attB</i> ::mini-CTX- <i>lacZ</i> mit -124 bp bis +42 bp upstream <i>nirJ</i> + pUCP20 <i>TnirL</i> , Carb ^R	Ressel, 2013
PAO1Δ <i>nirL</i> JW4 + pUCP20 <i>TnirDLGH</i>	PAO1Δ <i>nirL</i> #47325, <i>attB</i> ::mini-CTX- <i>lacZ</i> mit -124 bp bis +42 bp upstream <i>nirJ</i> + pUCP20 <i>TnirDLGH</i> , Carb ^R	Ressel, 2013

Tabelle 4: Verwendete Plasmide

Vektor	Charakteristika	Referenz
mini-CTX- <i>lacZ</i>	<i>lacZ</i> Reportergenfusion, Tet ^R	Becher & Schweizer, 2000
pJW0	mini-CTX- <i>lacZ</i> , Gentamicin Kasette kloniert in <i>PshAI</i> , Gm ^R	Walther, 2011
pJW4	mini-CTX- <i>lacZ</i> mit -124 bp bis +42 bp upstream <i>nirJ</i> , Gm ^R	Walther, 2011
pJW6	mini-CTX- <i>lacZ</i> mit -64 bp bis +14 bp upstream <i>nirJ</i> , Mutation in NirDLGH-Binderegion, Tet ^R	Walther, 2011
pJW9	mini-CTX- <i>lacZ</i> mit -124 bp bis +14 bp upstream <i>nirJ</i> , Tet ^R	Walther, 2011
pJW10	mini-CTX- <i>lacZ</i> mit -64 bp bis +14 bp upstream <i>nirJ</i> , Tet ^R	Walther, 2011
pACYCDuet-1	T7 Expressionsvektor, Cml ^R	Novagen
pACYC <i>nirDLGH</i>	pACYCDuet-1, His6- <i>nirDLGH</i> , kloniert in <i>EcoRI/HindIII</i> , Cml ^R	Walther, 2011
pBCM <i>cysG</i> 6	pACYC/pBAD, <i>CysG</i> (<i>Salmonella typhimurium</i>), Cml ^R	Schnell <i>et al.</i> , 2005
pETDuet1	T7 Expressionsvektor, Amp ^R	Novagen

pETDuet1 _{cysG}	pETDuet1, His6-CysG (<i>E. coli</i>), kloniert in <i>SacI/NotI</i> , Amp ^R	Walther, 2011
pFLP2	Ausgangsvektor der FLP Rekombinase, Amp ^R	Hoang <i>et al.</i> , 1998
pETDuet1 _{nirDL}	pETDuet-1, 1.MCS His6- <i>nirD</i> , 2.MCS <i>nirL</i> (<i>P. aeruginosa</i>), Amp ^R	Dieses Arbeit
pETDuet1 _{nirGH}	pETDuet-1, 1.MCS His6- <i>nirG</i> , 2.MCS <i>nirH</i> (<i>P. aeruginosa</i>), Amp ^R	Judith Streif
pACYC _{nirDL}	pACYCDuet-1, 1.MCS His6- <i>nirD</i> , 2.MCS <i>nirL</i> (<i>P. aeruginosa</i>), kloniert in <i>EcoRI/HindIII</i> (<i>nirD</i>), <i>NdeI/XhoI</i> (<i>nirL</i>), Cml ^R	Judith Streif
pUCP20T	pRO1600 Derivat, <i>E. coli</i> - <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> Shuttlevektor, Amp ^R /Carb ^R (<i>E. coli</i>), Carb ^R (<i>P. aeruginosa</i>)	Hebecker 2011
pUCP20T _{nirL}	pUCP20T, His6- <i>nirL</i> , Fusionsvektor für <i>P. aeruginosa</i> , Carb ^R	Diese Arbeit
pUCP20T _{nirH}	pUCP20T, His6- <i>nirH</i> , Fusionsvektor für <i>P. aeruginosa</i> , Carb ^R	Diese Arbeit
pUCP20T _{nirDLGH}	pUCP20T, His6- <i>nirDLGH</i> , Fusionsvektor für <i>P. aeruginosa</i> , Carb ^R	Walther 2011
pET22b(+)	<i>E. coli</i> Plasmid, Amp ^R , MCS: <i>pelB</i> Signalsequenz N-terminal, His6 C-terminal	
pET22b _{nirDL} (<i>H.th.</i>)	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i> kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit His6-Tag	Judith Streif
pET22b _{nirDL} H93A (<i>H.th.</i>)	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i> kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit His6-Tag, AS- Austausch H93A	Diese Arbeit
pET22b _{nirDL} H93S (<i>H.th.</i>)	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i> kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit His6-Tag, AS- Austausch H93S	Diese Arbeit
pET22b _{nirDL} H93Q (<i>H.th.</i>)	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i> kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit His6-Tag, AS- Austausch H93Q	Diese Arbeit

pET22bnirDL Y95L (<i>H.th.</i>)	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i> kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit <i>His6</i> -Tag, AS- Austausch Y95L	Diese Arbeit
pET22bnirDL R97K (<i>H.th.</i>)	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i> kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit <i>His6</i> -Tag, AS- Austausch R97K	Diese Arbeit
pET22bnirDL R139A (<i>H.th.</i>)	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i> kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit <i>His6</i> -Tag, AS- Austausch R139A	Diese Arbeit
pET22bnirDL R139K (<i>H.th.</i>)	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i> kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit <i>His6</i> -Tag, AS- Austausch R139K	Diese Arbeit
pET22bnirDL R218A (<i>H.th.</i>)	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i> kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit <i>His6</i> -Tag, AS- Austausch R218A	Diese Arbeit
pET22bnirDL R218K (<i>H.th.</i>)	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i> kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit <i>His6</i> -Tag, AS- Austausch R218K	Diese Arbeit
pET22bnirDL R219Q (<i>H.th.</i>)	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i> kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit <i>His6</i> -Tag, AS- Austausch R219Q	Diese Arbeit
pET22bnirDL H226Q (<i>H.th.</i>)	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i> kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit <i>His6</i> -Tag, AS- Austausch H226Q	Diese Arbeit
pET22bnirDL H261A (<i>H.th.</i>)	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i> kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit <i>His6</i> -Tag, AS- Austausch H261A	Diese Arbeit
pET22bnirDL H261S (<i>H.th.</i>)	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i> kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit <i>His6</i> -Tag, AS- Austausch H261S	Diese Arbeit
pET22bnirDL Y263F (<i>H.th.</i>)	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i> kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit <i>His6</i> -Tag, AS- Austausch Y263F	Diese Arbeit
pET22bnirDL	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i>	Diese Arbeit

R265A (<i>H.th.</i>)	kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit <i>His6</i> -Tag, AS-Austausch R265A	
pET22bnirDL	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i>	Diese Arbeit
R265K (<i>H.th.</i>)	kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit <i>His6</i> -Tag, AS-Austausch R265K	
pET22bnirDL	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i>	Diese Arbeit
K314Q (<i>H.th.</i>)	kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit <i>His6</i> -Tag, AS-Austausch K314Q	
pET22bnirDL	pET22b(+) mit NirDL aus <i>H. thermophilus</i>	Diese Arbeit
H261L + K314Q (<i>H.th.</i>)	kloniert in <i>NdeI/XhoI</i> mit <i>His6</i> -Tag, AS-Austausch H261L und K314Q	

3.5 Mikrobiologische Techniken

3.5.1 Sterilisation

Die in dieser Arbeit genutzten Medien und Puffer wurden alle, wenn nicht anders angegeben, für 20 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck im Autoklaven sterilisiert. Temperaturempfindliche Substanzen, wie Antibiotika, wurden sterilfiltriert (0,2 µm Porendurchmesser, Sartorius).

3.5.2 Bakterienkultivierung auf Agarplatten

Mit einer sterilen Impföse wurden Bakterien aus einer Glycerinkultur entnommen und auf einer LB-Agar-Platte, die bei Bedarf mit einem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, ausgestrichen. Die Platte wurde circa 16 h bei 37 °C inkubiert.

Bakterien aus einer Flüssigkultur wurden auf der LB-Agar-Platte mithilfe von sterilen Glasperlen ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Zum Überimpfen von Bakterienkulturen von einer Agarplatte auf eine andere wurden sterile Zahnstocher oder eine Impföse benutzt.

<u>LB-Platten:</u>	5 g/L Hefeextrakt
	10 g/L Trypton
	10 g/L NaCl
	15 g/L Agar-Agar

3.5.3 Bakterienkultivierung in Flüssigkultur

Mit einer sterilen Impföse oder Pipettenspitze wurden Bakterien, von einer LB-Agar-Platte oder aus einer Glycerinkultur, entnommen und in das Nährmedium überführt. Dem Nährmedium wurden gegebenenfalls die entsprechenden Antibiotika zugegeben. Falls nicht anders angegeben, wurden für aerobe Kulturen jeweils 30 mL Kultur in 100 mL Schikanekolben schüttelnd, bei 200 rpm und 37 °C für 16 h, inkubiert. Für aerobe Kulturen in kleinerem Maßstab wurden 8 inokuliertes LB-Medium in einem Reagenzglas, bei 37 °C und 200 rpm, inkubiert.

<u>LB-Medium:</u>	5 g/L Hefeextrakt
	10 g/L Trypton
	10 g/L NaCl

3.5.4 Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika wurden als Konzentrate angesetzt und sterilfiltriert. Die Tabelle 5 zeigt mit welcher Endkonzentration die Stammlösungen den autoklavierten, abgekühlten Medien zugegeben wurden:

Tabelle 5: In der Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	Organismus
Ampicillin	100 mg/mL in Wasser	100 µg/mL	<i>E. coli</i>
Carbenecillin	100 mg/mL in Wasser	100 µg/mL	<i>E. coli</i>
	250 mg/mL in Wasser	250 µg/mL	<i>P. aeruginosa</i>
Chloramphenicol	34 mg/mL in 70 % Ethanol	34 µg/mL	<i>E. coli</i>
Gentamycin	50 mg/mL in Wasser	50 µg/mL	<i>P. aeruginosa</i>
Tetracyclin	12,5 mg/mL in 100 % Ethanol	12,5 µg/mL	<i>E. coli</i>
	80 mg/mL in 100 % Ethanol	80 µg/mL	<i>P. aeruginosa</i>

3.5.5 Anlegen von Glycerinkulturen

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienkulturen wurde 1 mL einer Bakterienkultur 2 min bei 9.000 x g zentrifugiert und das Sediment in 600 µL der Kultur gelöst. Anschließend wurden 300 µL 80 % (v/v) Glycerin hinzugegeben.

3.5.6 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte wurde bei einer Wellenlänge von 578 nm mithilfe einer 1 cm-Einwegküvette im UV/Vis Spektrophotometer (Ultrospec 2100 pro, GE Healthcare) durchgeführt.

3.5.7. Anaerobe Wachstumskurven von *P. aeruginosa*

Für die Untersuchung verschiedener *P. aeruginosa*-Stämme wurden anaerobe Wachstumskurven aufgenommen. Dazu wurden sterile 125 mL-Transfusionsflaschen mit AB- oder LB-Medium (siehe 3.5.3), 50 mM NaNO₃ und gegebenenfalls Antibiotikum versetzt. Diese wurden ausgehend von einer aeroben Vorkultur mit einer OD₅₇₈ von 0,3 beimpft, mit einem Silikonseptum incl. Schraubdeckel verschlossen und bei 37 °C und 120 rpm im Wasserbadschüttler inkubiert. Es wurden von jedem Stamm stündlich Proben entnommen und die OD₅₇₈ gemessen. Die letzte Messung erfolgte 24 Stunden nach Beginn des Versuches.

<u>AB-Medium:</u>	100 mL A10-Lsg.
	20 mL 1 M Glucose
	1 mL Spurenelemente
	1 mL 1 M MgCl_2
	0,5 mL $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
	0,1 mL 1 M CaCl_2

Das Gesamtvolumen betrug 1 L und wurde mit sterilem MilliQ-Wasser aufgefüllt.

<u>A10-Lösung:</u>	20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
	30 g KH_2PO_4
	90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

Mit sterilem MilliQ-Wasser wurde das Gesamtvolumen von 1 L aufgefüllt.

<u>Spurenelementlösung:</u>	200 mg $\text{CaSO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
	200 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
	20 mg $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
	20 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
	20 mg $\text{ZnSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
	10 mg $\text{NaMoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
	5 mg H_3BO_3

Die Spurenelemente wurden in MilliQ-Wasser gelöst und auf 1 L aufgefüllt.

3.6 Molekularbiologische Techniken

3.6.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen (CaCl_2 -Methode)

Ausgehend von einer Vorkultur wurden 100 mL LB-Medium 1:100 inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD_{578} von 0,6 bis 0,8 inkubiert. Im Anschluss wurden die Kulturen in zwei 50 mL Zentrifugationsgefäße überführt und 10 min auf Eis abgekühlt. Darauf folgte ein Sedimentationschritt bei 4 °C und 4000 rpm (Megafuge 1.0 R, Heraeus) für 10 min. Das entstandene Sediment wurde in 10 mL eiskaltem 0,1 M CaCl_2 /10 % Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu 50 µL Portionen aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.6.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Für die Transformation wurden 5 µL eines Ligations-/QuikChange-Ansatzes oder 1 µL Plasmid-DNA zu 50 µL kompetenten *E. coli* Zellen gegeben und diese 20 min auf Eis inkubiert. Im Folgenden wurde der Ansatz für 30 sec im Thermomixer (5436, Eppendorf) bei 42 °C und danach wiederum 2 min auf Eis inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde dem Ansatz 500 µL LB-Medium zugegeben und der Ansatz wurde eine weitere Stunde bei 37 °C und 700 rpm im Thermomixer inkubiert. Es wurden 20 µL und 50 µL des Ligations- und 250 µL des QuikChange-Ansatzes auf LB-Medium, mit dem entsprechenden Antibiotikum, ausgestrichen und 16 h bei 37 °C inkubiert.

3.6.3 Herstellung elektrokompenter *P. aeruginosa*-Zellen

Um *P. aeruginosa*-Zellen für die Elektroporation vorzubereiten, wurde zunächst eine LB-Agar-Platte großzügig mit dem zu transformierenden Stamm beimpft und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der komplette Bakterienrasen von der Platte abgeschabt und in 1 mL steriler 0,3 M Saccharose-Lösung aufgenommen. Daraufhin wurden die Zellen für 2 min bei 9.000 ×g sedimentiert und erneut in 1 mL 0,3 M Saccharose-Lösung aufgenommen. Dieser Schritt wurde wiederholt und letztendlich das Zellsediment in 100-1000 µL 0,3 M Saccharose-Lösung gelöst. Die erhaltenen elektrokompenten Zellen wurden direkt für die Transformation von Plasmid-DNA eingesetzt.

3.6.4 Elektroporation von *P. aeruginosa*

Um *P. aeruginosa*-Zellen zu elektroporieren wurden zuerst 1 µL Plasmid-DNA mit 100 µL elektrokompenten Zellen vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite: 2 mm) überführt. Für diese Elektroporation wurden folgende Einstellungen des GenePulserII vorgenommen:

Kapazität	25,0 µF
Spannung	2,5 kV
Widerstand	200,0 Ω
Dauer des Spannungsstoßes	ca. 4,0 - 5 ms

Nachdem die Einstellungen vorgenommen wurden, erfolgte die Pulsgabe. Im Anschluss wurde sofort 1 mL LB-Medium der Zellsuspension zugefügt und diese für 1 h bei 37 °C und 700 rpm inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden 5 µL, 10 µL und 50 µL der Zellen auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und bei 37 °C für 16 h inkubiert.

3.6.5 Biparental Mating

Eine weitere Möglichkeit um DNA in *P. aeruginosa* einzubringen ist das *biparental Mating*. Hierzu wurde das zu transformierende Plasmid in den *E. coli*-Stamm ST18 (Thoma & Schobert, 2009) transformiert (siehe 3.6.2). Ausgehend von einer über Nacht-Vorkultur wurden 1 mL ST18-Zellen mit 100 µL einer *P. aeruginosa* über Nacht-Vorkultur vermischt und für 2 min bei 9.000 ×g sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 100 µL LB-Medium resuspendiert, mit 1 µL 5-Aminolevulinsäure (75 mg/mL) versetzt und als feiner Tropfen auf eine LB-Agar-Platte aufgetragen. Nach dem vollständigen Trocknen des Tropfens wurde die Platte für 6 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einer Impföse von der Agar-Platte abgetragen und in 1 mL LB-Medium aufgenommen. Davon wurden unterschiedliche Mengen auf LB-Agar-Platten, welche mit dem entsprechenden Antibiotikum versehen waren, ausplattiert und weitere 16 h bei 37 °C inkubiert. Für den Fall, dass das Plasmid oder Teile davon in das Chromosom integriert werden sollten, wurde bei dem ersten Mating das Plasmid mini-CTX-*lacZ* verwendet. An den auf das Mating folgenden zwei Tagen wurden mindesten 8 Klone pro Stamm auf ihre Plasmid-vermittelte Antibiotikaresistenz per Vereinzelungsausschlag getestet. Anschließend wurde ein zweites Mating durchgeführt, das dazu diente, die Resistenzkassette und große Teile des ersten Vektors aus dem Genom wieder herauszuschneiden. Die Durchführung erfolgte wie im ersten Teil beschrieben außer dass hierfür 1 mL ST18-Zellen, welche das Plasmid *pFLP2* trugen, mit 200 µL *P. aeruginosa*-Zellen aus dem ersten Mating vermischt wurden. An den darauffolgenden zwei Tagen wurden wieder mindestens 8 Klone auf die Plasmid-vermittelte Resistenz getestet und im Anschluss zwei Mal auf LB-Agar-Platten, welche mit 5 % Saccharose supplementiert waren, vereinzelt. Mithilfe der Saccharose wurde sichergestellt, dass die *P. aeruginosa*-Stämme das aufgenommene *pFLP2*-Plasmid wieder abgegeben haben, aufgrund des enthaltenen *sacB*-Gens. Dann wurde die nun vorausgesetzte Antibiotikumsensitivität anhand eines Vereinzelungsausschlags

kontrolliert und positive Klone mittels PCR auf Integration des Promotors und des *lacZ*-Gens ins Genom untersucht.

PCR-Ansätze:

0,2 µL Taq-Polymerase (5000 U/mL)

je 2 µL oNB51 & oNB53 Primer (10 pmol)

2 µL 10x ThermoPol Reaction Buffer

0,5 µL dNTPs (10 mM)

13,3 µL Wasser

Von den positiven Klonen wurde mit einer sterilen Pipettenspitze etwas Zellmaterial in die fertigen PCR-Ansätze eingerührt und im Anschluss wurde die PCR mit folgendem Programm im Thermocycler durchgeführt.

Tabelle 6: PCR-Temperaturprogramm zur Überprüfung des Matings

95 °C	5 min	Initiale Denaturierung der DNA	
95 °C	30 sec	Denaturierung der DNA	} 30x
58 °C	40 sec	Annealing der Primer	
72 °C	40 sec	Elongation der DNA	
72 °C	5 min	Finale Elongation	

Ob die Amplifikation und somit die Integration des Promotorbereichs und des *lacZ*-Gens ins Genom erfolgreich war, wurde anschließend durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft.

Das erwartete Fragment hatte eine Größe von 548 bp.

3.6.6 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurden 8 mL LB-Medium mit den *E. coli*-Stämmen beimpft, die das zu präparierende Plasmid enthielten. Dem Medium wurde, je nach Bedarf, das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Die Flüssigkulturen wurden 16 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden zweimal 2 mL in einem 2 mL-Reaktionsgefäß für 2 min bei 13.000 xg zentrifugiert und der Überstand

verworfen. Das Sediment wurde in 300 µL Resuspensionspuffer aufgenommen. Als nächstes wurden 300 µL Lysis-Sol II hinzugegeben und vorsichtig gemischt, womit die Zellen lysiert wurden. Anschließend wurden 300 µL Lysis-Sol III zugegeben und wieder vorsichtig gemischt. Hierbei kam es zur Denaturierung zellulärer Proteine. Der Ansatz wurde für mindestens 15 Minuten bei 16.000 xg zentrifugiert, was zur Trennung von Proteinen, genomischer DNA und Membranfragmenten im Sediment und Plasmid-DNA im Überstand, führte. Der Überstand wurde vorsichtig ohne weißen Niederschlag in ein steriles 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde zur Präzipitation der Plasmid-DNA 600 µL Isopropanol hinzugegeben. Der Ansatz wurde gut gemischt und mindestens 30 min bei 16.000 xg sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Sediment mit 400 µL 70 % Ethanol 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Im Weiteren wurden das Pellet mithilfe der Speedvac getrocknet und in 30 µL sterilem dest. H₂O gelöst. Um zu kontrollieren, ob die Präparation erfolgreich war, wurde eine Agarosegelelektrophorese (siehe 3.6.7) durchgeführt.

<u>Resuspensionspuffer:</u>	50 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/mL RNase A
<u>Lysis-Sol II:</u>	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
<u>Lysis-Sol III:</u>	4 M Kaliumacetat 11,4 % (v/v) Essigsäure

3.6.7 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine DNA-Gelelektrophorese, mithilfe eines 1 % Agarosegels in TAE-Puffer bei 120 V, durchgeführt. Hierfür wurden fünf Einheiten DNA-Lösung mit einer Einheit 6x Probenpuffer versetzt und neben den GeneRuler DNA Ladder Mix (ThermoScientific) auf das Agarosegel aufgetragen. Das Gel wurde, nach Beendigung, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid gefärbt. Dadurch werden DNA-haltige Gelbereiche, bei Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 312 \text{ nm}$ visualisiert, welche dann über eine Geldokumentationsanlage (GelDoc) digitalisiert werden konnten.

<u>TAE-Puffer:</u>	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
<u>Agarosegel:</u>	1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer
<u>Ethidiumbromid:</u>	0,1 % (w/v) Ethidiumbromid in Wasser

3.6.8 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mithilfe eines Nano-Drop-Spektrometers bestimmt. Bei 260 nm wird das Absorptionsmaximum von DNA gemessen.

Eine gemessene Absorption von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/mL bei dem Einsatz von doppelsträngiger DNA. Über dieses Verhältnis ließ sich die Konzentration der DNA bestimmen.

3.6.9 Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifikation

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Hierzu wurde der folgende Ansatz eingesetzt:

1 µL template DNA (100 ng)
je 1 µL Primer (10 pmol)
0,5 µL Phusion-Polymerase (2000 U/mL)
10 µL 5x HF-Puffer
5 µL dNTPs (2,5 mM)
31,5 µL Wasser
50 µL Gesamtvolumen

Tabelle 7: Allgemeines Temperaturprogramm der PCR

96 °C	1 min	Initiale Denaturierung der DNA	
96 °C	30 sec	Denaturierung der DNA	} 25x
50 °C	30 sec	Annealing der Primer	
72 °C	40 sec	Elongation der DNA	
72 °C	5 min	Finale Elongation	

Zur Kontrolle, ob die Amplifikation erfolgreich war, wurde anschließend eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

3.6.10 Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten erfolgte bei einem präparativen Restriktionsverdau in 20 µL und bei einem analytischen Restriktionsverdau in 10 µL Ansätzen. Hierzu wurden 3 U der Restriktionsendonukleasen pro µg DNA eingesetzt. Die Restriktion erfolgte, in dem vom Hersteller angegebenen Puffer, bei 37 °C für 2 h. Bei gleichzeitigem Verdau mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen wurde ein Puffer ermittelt, in dem beide Enzyme eine hohe Aktivität aufwiesen.

3.6.11 Reinigung von DNA-Fragmenten

Zur Reinigung eines DNA-Fragments wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt und die Fragmentbanden, mithilfe einer Rasierklinge, aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden anschließend mit dem QIAquick®Gel Extraction Kit (QIAGEN), nach Angaben des Herstellers, gereinigt und mit 30 µL sterilem H₂O eluiert. DNA-Lösungen wurden nach einer PCR mit dem QIAquick®PCR Purification Kit (QIAGEN), nach Angaben des Herstellers, gereinigt und ebenfalls mit 30 µL sterilem H₂O eluiert. Um die Ausbeute der Reinigung zu untersuchen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

3.6.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µL. Dazu wurden Vektor und Insert in einem Verhältnis von 1:3 mit 1 µL T4-DNA-Ligase und 4 µL Rapid Ligation Buffer vermischt und mit sterilem Wasser auf 20 µL Gesamtvolumen aufgefüllt. Im Anschluss wurde der Ligationsansatz für 5 Minuten bei RT inkubiert.

3.6.13 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese von DNA wurde, mittels des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, USA) und des Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (NEB, USA) durchgeführt. Zur Mutagenese wurden Primer eingesetzt,

die an einer bzw. mehreren Positionen Mutationen trugen. Sense- und Antisense-Primer wurden so synthetisiert, dass sie zueinander komplementär waren, wenn das QuikChange Kit genutzt wurde. Bei Zuhilfenahme des Q5 Kits wurden die Primer nicht überlappend designt. Voraussetzung für die ortsgerichtete Mutagenese war, dass das zu mutierende Gen in einem entsprechenden Vektor, hier in pET22bnirDL (*H.th.*), kloniert vorlag. Im Verlauf der PCR binden die beiden Primer zunächst an die Bereiche der denaturierten parentalen Sense- und Antisense-DNA, in die die Mutation eingefügt werden soll. Die *Pfu*-DNA-Polymerase verlängert sie in beide Richtungen. Es entstehen zirkuläre Stränge, die jeweils einen Bruch tragen. In folgenden PCR-Zyklen werden diese Stränge vermehrt. Anschließend wurde den Ansätzen 0,5 µL *DpnI* hinzugefügt. Diese wurden 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 10 min bei 65 °C inaktiviert. Da die parentale DNA, durch Modifikationssysteme des Wirtsbakteriums, methyliert vorliegt, kann sie von der amplifizierten, mutierten DNA unterschieden und folglich von der Restriktionsendonuklease *DpnI* selektiv verdaut werden. Die mutierten Plasmide wurden im nächsten Arbeitsschritt in *E. coli* XL10-gold Zellen transformiert, die die Strangbrüche reparieren. Über eine Plasmid-Präparation wurde die DNA isoliert, gereinigt und anschließend sequenziert. So wurden alle NirDL-Varianten erzeugt. Welche Primer für die einzelnen Mutationen eingesetzt wurden, ist der Oligonukleotid-Tabelle zu entnehmen.

3.6.14 Bestimmung der DNA-Sequenz

Um sicherzustellen, dass bei der Amplifikation mit der Phusion-Polymerase keine ungewollten Basenaustausche stattgefunden haben, wurde die Sequenz aller amplifizierten Fragmente, durch eine Sequenzierung, bestimmt. Ebenfalls wurde überprüft, ob die ortsgerichtete Mutagenese erfolgreich war und mit der Datenbank verglichen. Für die Sequenzierung wurden 20 µL DNA-Lösung mit einer Konzentration von 30-100 ng/µL an die GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) geschickt, wo die Sequenzierung durchgeführt wurde.

3.7 Biochemische Techniken

3.7.1 β -Galactosidase Enzymtest

Um die Aktivität des *nirJ*-Promotors unter unterschiedlichen Kulturbedingungen zu untersuchen wurden Reporterfusionen mit dem *lacZ*-Gen erzeugt. Das *lacZ*-Gen kodiert das Enzym β -Galactosidase, welches das chromogene Substrat o-Nitrophenol- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) zu Nitrophenol spalten kann, dessen Gelbfärbung photometrisch vermessen wurde.

Dazu wurden in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (welche vorher für jeden Stamm ermittelt wurde) jeder Bakterienkultur zweimal 2 mL Kultur aus den Probenflaschen entnommen und für 2 min bei 16.000 xg sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 800 μ L Z-Puffer resuspendiert und mit je 25 μ L Chloroform und 0,1 % SDS versetzt. Nach 15 minütiger Inkubation bei 37 °C und 1000 rpm wurden 200 μ L o-Nitrophenol- β -D-Galaktopyranosid Lösung (ONPG) (4 mg/mL) hinzugefügt, um die Reaktion zu starten. Bei Eintritt einer Gelbfärbung wurde die Reaktion, durch Zugabe von 500 μ L 1 M Na₂CO₃-Lösung, beendet und die Reaktionszeit notiert. Anschließend wurde die Absorption bei 420 nm und 550 nm photometrisch bestimmt. Die Aktivität der β -Galactosidase wird in Miller Units ausgedrückt (Miller, 1972). Jeder Enzymtest wurde in einem Doppelansatz durchgeführt.

$$U = \frac{OD_{420} - (1,75 \cdot OD_{550})}{OD_{578} \cdot V \cdot t} \cdot 1000$$

U: Miller Units

OD₄₂₀: Optische Dichte der Probe bei 420 nm

OD₅₅₀: Optische Dichte der Probe bei 550 nm

OD₅₇₈: Optische Dichte der eingesetzten Zellsuspension bei 578 nm

V [mL]: Volumen der eingesetzten Zellsuspension

t [min]: Zeit der Enzymreaktion bis zum Abstoppen

Z-Puffer:

60 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O

40 mM NaH₂PO₄ x H₂O

10 mM KCl

1 mM MgSO₄ x H₂O

50 mM β -Mercaptoethanol

ONPG-Lösung: 4 mg/mL ONPG

Stopp-Lösung: 1 M Na₂CO₃

3.7.2 Heterologer Proteinproduktionstest zur Ermittlung geeigneter Produktionsbedingungen

Um die idealen Produktionsbedingungen für jedes einzelne Protein zu ermitteln, wurde ein Produktionstest durchgeführt. Hierbei wurden unterschiedliche IPTG-Konzentrationen, Temperaturen und Inkubationsdauer untersucht.

Hierzu wurden 500 mL LB-Medium in einem 1L-Schikanekolben, welches mit entsprechenden Antibiotika versetzt war, ausgehend von einer über Nacht-Vorkultur im Verhältnis 1:100 beimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,6-0,8 wurde zunächst eine 1 mL Probe entnommen und sedimentiert. Anschließend wurden die Kulturen mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen induziert. Für die weitere Kultivierung wurden verschiedene Temperaturen gewählt. In den ersten 4 h wurde stündlich und nach 24 h eine 1 mL Probe entnommen und für 2 min bei 16.000 xg sedimentiert. Zusätzlich dazu wurde die OD₅₇₈ bestimmt. Die entnommenen Proben wurden wie in Kapitel 3.7.10 analysiert.

3.7.3 Proteinproduktion von NirDLGH (*P. aeruginosa*)

Die rekombinanten Proteinkomplexe NirDL und NirGH aus *P. aeruginosa* wurden nach dem zuvor von Johannes Walther (2011) beschriebenen Protokoll folgendermaßen produziert. Ausgehend von einer *E. coli*-Vorkultur, welche das Plasmid pACYC*nirDL* oder pETDuet*nirGH* trug, wurden 500 mL LB-Medium, welches mit dem entsprechenden Antibiotikum versehen war, in einem 1 L-Schikanekolben 1:100 inokuliert. Das übliche Produktionsvolumen betrug mindestens 4 L. Im Anschluss wurden die Kulturen bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₇₈ 0,6-0,8 inkubiert und darauf die Proteinproduktion mit 250 µM IPTG initiiert. Die Proteinproduktion von NirDL erfolgte weitere 4 h bei 37 °C und 180 rpm und die Zellen zur Produktion von NirGH wurden circa 16 h bei 17 °C und ebenfalls 180 rpm inkubiert.

3.7.4 Proteinproduktion von NirDL (*H. thermophilus*) und der NirDL-Varianten

Die Proteinproduktion des Fusionsproteins NirDL aus *H. thermophilus*, welches ein Homologon des NirDL aus *P. aeruginosa* darstellt, wurde bereits von Johannes Gädke (2011) beschrieben. Hierzu wurden 500 mL LB-Medium, welches mit entsprechendem Antibiotikum versehen war, mit einer *E. coli*-Vorkultur, welche das Plasmid pET22bnirDL(*H.th.*) trug, 1:100 inokuliert. Das Produktionsvolumen lag zwischen 1 und 2 L. Die Hauptkulturen wurden bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6-0,8 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert und im Anschluss mit 125 µM IPTG induziert. Danach erfolgte die Produktion bei 17 °C und 180 rpm für 16 h.

3.7.5 Proteinproduktion von CysG

Um die Sirohäm Synthase CysG zu produzieren, was hauptsächlich zur Gewinnung des Sirohäms geschah, wurden Gene aus zwei verschiedenen Organismen genutzt. Die *E. coli*-Vorkulturen trugen entweder das Plasmid pBCM-cysG6, welches das *cysG*-Gen aus *Salmonella thyphimurium* enthielt oder das Plasmid pETDuetcysG, welches das Gen aus *E. coli* enthielt. Zur Produktion wurde 1 L LB-Medium in einem 1 L-Erlenmeyerkolben ohne Schikane mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit einer Vorkultur 1:100 beimpft. Bei 37 °C und 100-120 rpm wurden die Kulturen circa 6 h bis zu einer OD₅₇₈ von 0,3 inkubiert. Im Anschluss wurde die Proteinproduktion mit 0,01 % Arabinose (pBCM-cysG6) bzw. 250 µM IPTG (pETDuetcysG) für 17 h und 80-100 rpm gestartet.

3.7.6 Zellernte

Im Anschluss an die Kultivierung wurden die Zellen sedimentiert. Dafür wurden die Ansätze in 1 L-Erntebecher überführt und 20 min bei 4 °C und 3000 xg zentrifugiert. Dann wurde der Überstand verworfen, das Sediment mithilfe von 10 mL NirDLGH-Proteinpuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Im Falle der CysG-produzierenden Zellen wurde das Sediment in TBS aufgenommen und für 10 min bei 4 °C und 4000 xg zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Sediment ohne Überstand bis zur weiteren Verwendung in den Enzymaktivitätstest bei -20 °C gelagert.

NirDLGH-Proteinpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5
300 mM NaCl
5 % (v/v) Glycerin

TBS: 50 mM Tris/HCl pH 7,6
150 mM NaCl

3.7.7 Zellaufschluss und Zentrifugation

Der Zellaufschluss erfolgte stets durch die French-Press. Hierzu wurde die Zellsuspension zuerst mit NirDLGH-Proteinpuffer auf das Volumen von 30 mL aufgefüllt und anschließend in 2 Durchgängen in der vorgekühlten French-Press-Zelle bei circa 19.200 psi aufgeschlossen. Die Trennung von unlöslichen und löslichen Zellbestandteilen erfolgte je nach Proteinproduktion und weiterem Verwendungszweck unterschiedlich. So wurde die Reinigung für das Fusionsprotein NirDL aus *H. thermophilus* mit zwei Zentrifugationsschritten von 1 h bei 4 °C und 20.000 xg weitergeführt. Zwischen den beiden Zentrifugationen wurde ein Hitzeschock für 10 min bei 65 °C eingesetzt, bei welchem die löslichen *E. coli*-Proteine ausfielen. Wohingegen das Fusionsprotein NirDL aufgrund seiner Thermostabilität in Lösung blieb.

Die Abtrennung von Zelltrümmern bei den Komplexen NirDL und NirGH aus *P. aeruginosa* erfolgte in den meisten Fällen durch eine Zentrifugation von 1,5 h bei 4 °C und 20.000 x g.

Sollte das gereinigte Protein später zur Kristallisation eingesetzt werden, so wurden die unlöslichen Zellbestandteile bei 110.000 x g bei 4 °C für 1 h abgetrennt.

3.7.8 Affinitätschromatographie mittels Nickel-Chelat-Komplex

Die Reinigung der mit His₆-fusionierten Proteine erfolgte über eine Affinitätschromatographie mithilfe der Ni-NTA-Agarose von Macherey-Nagel. Zunächst wurden 2,5 mL Säulenmaterial mit 5 SV Waschpuffer äquilibriert und im Anschluss der lösliche Proteinüberstand nach Zentrifugation auf die Säulenmatrix aufgetragen. Ungebundene und unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 20 SV Waschpuffer heruntergewaschen. Die vom Hersteller empfohlene Präelution mit einer mittleren Konzentration von Imidazol wurde aufgrund des großen Verlusts von Zielprotein durch die Verlängerung des Waschschrilles ersetzt. Die Elution des Proteins

erfolgte durch 5 x 1 mL Elutionspuffer und diese Fraktionen wurden gesammelt und mitsamt allen Proben, die zu jedem Reinigungsschritt entnommen wurden, mithilfe einer SDS-PAGE analysiert (siehe 3.7.10). Die Säulenmatrix wurde nach mehrmaliger Benutzung nach Herstellerangaben regeneriert und auch nach diesen Angaben gelagert.

<u>Waschpuffer:</u>	50 mM Tris/HCl pH 7,5
	300 mM NaCl
	5 % (v/v) Glycerin
	20 mM Imidazol

<u>Elutionspuffer:</u>	50 mM Tris/HCl pH 7,5
	300 mM NaCl
	5 % (v/v) Glycerin
	200 mM Imidazol

3.7.9 Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) funktioniert nach dem Prinzip, dass kleinere Proteine langsamer als größere durch die poröse Matrix wandern und es dadurch zu einer Trennung aufgrund des hydrodynamischen Volumens kommt.

Die GPC wurde zum einen präparativ eingesetzt, um die Proteine für die Kristallisation weiter zu reinigen und zum anderen zu analytischen Zwecken, um die Bindung des Substrats bzw. Substratanalogon an die Proteine zu untersuchen.

Die präparative GPC wurde wie zuvor von Theresa Kriegler (2012) beschrieben durchgeführt. Hierfür wurde die HiLoad 26/60 Superdex 75-Säule (GE Healthcare, Deutschland) zusammen mit dem Äkta Purifier System (GE Healthcare, Deutschland) eingesetzt worden. Die Chromatographie wurde mit einer Flussrate von 2 mL/min durchgeführt. Nach einem Volumen von 90 mL startete die Fraktionierung in 2 mL Fraktionen um das gereinigte Protein aufzufangen.

<u>GPC-Puffer:</u>	50 mM Tris/HCl pH 7,5
	150 mM NaCl
	5 % (v/v) Glycerin
	1 mM DTT

Mithilfe der 10/300 Superdex 75 (GE Healthcare, Deutschland), bei einer Flussrate von 0,7 mL/min in NirDLGH-Proteinpuffer (siehe 3.7.6), wurden die analytischen Ansätze untersucht. Hierzu wurden jeweils 1,35 mg/mL NirDL aus *H. thermophilus* mit einem Ansatz in dem 1,35 mg/mL Protein und äquimolare Menge Substratanalogon enthalten waren, verglichen. Die Größen der aufgetretenen Proteinkomplexe wurden mittels Proteinstandards von Sigma-Aldrich bestimmt.

3.7.10 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladungen von Proteinen überdeckt und eine vollständige Entfaltung der Peptidkette bewirkt. Die Oberflächenladung wird gleichzeitig durch die SDS-Bindung neutralisiert. Die Trennleistung der SDS-PAGE beruht ausschließlich auf dem Molekularsiebeffekt. Aufgrund des Konzentrierungseffektes der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wird zusätzlich eine sehr hohe Auflösung erzielt. Für die Elektrophorese wurden 40 µL Proteinlösung mit 40 µL 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend für 5 min bei 95 °C denaturiert. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen wurden durch Zugabe von β-Mercaptoethanol reduziert. Über die Bestimmung der Wanderungstrecken der SDS-Polypeptidketten und dem Vergleich mit einem Proteinstandard, mit bekannten Größen, können die Molekulargewichte der Proteine ermittelt werden. In dieser Arbeit wurden 6%ige Sammelgele und 12%ige Trenngele eingesetzt. Die Gele wurden mithilfe des Mini Protean Tetra Cell Systems (BioRad, München, Deutschland) gegossen. Anschließend wurden 20 µL der Proteinlösung, zusammen mit dem Unstained PageRuler (ThermoScientific, USA), auf das Gel aufgetragen und etwa 30 min bei 45 mA aufgetrennt. Durch eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blue wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel für 30 min mit Färbelösung inkubiert und anschließend mit Entfärbelösung behandelt. Zum Schluss wurden die Gele digitalisiert und getrocknet.

Sammelgel (6 %) für 4 Gele:

2 mL Rotiphorese Gel 30
2,5 mL Sammelgelpuffer
5,5 mL H₂O
10 µL TEMED
100 µL APS

<u>Sammelgelpuffer:</u>	0,4 % (w/v) SDS 0,5 M Tris/HCl pH 6,8
<u>Trenngel (12 %) für 4 Gele:</u>	8 mL Rotiphorese Gel 30 5 mL Trenngelpuffer 7 mL H ₂ O 20 µL TEMED 200 µL APS
<u>Trenngelpuffer:</u>	0,4 % (w/v) SDS 1,5 M Tris/HCl pH 8,8
<u>10x Elektrophoresepuffer:</u>	192 mM Glycin 1 % (w/v) SDS 250 mM Tris
<u>2x Probenpuffer:</u>	40 % (v/v) Glycerin 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol 3,2 % (w/v) SDS 0,2 % (w/v) Bromphenolblau 100 mM Tris/HCl pH 6,8
<u>Färbelösung:</u>	10 % (v/v) Essigsäure 30 % (v/v) Ethanol 1 g/L Coomassie Brilliant Blue G-250
<u>Entfärberlösung:</u>	30 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure

3.7.11 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der gereinigten Proteine wurde mithilfe des Bradford Reagenz durchgeführt. Hierzu wurden 1,5 mL des Reagenz mit 50 µL Proteinprobe versetzt und nach 5-minütiger Inkubation innerhalb der folgenden 45 min bei einer OD

von 595 nm vermessen. Außerdem wurde eine Kalibriergrade mit definierten BSA-Konzentrationen erstellt.

3.7.12 Konzentrierung von Proteinlösungen

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurden die Amicon Ultra 0,5 mL-Zentrifugationsfilter (Merck Millipore, USA), nach Angaben des Herstellers, verwendet. Die Ausschlussgrenze lag bei ca. 10 kDa.

3.7.13 Umpuffern von Proteinlösungen

Wenn Proteinlösungen in einem anderen Puffer vorlagen als für spätere Tests benötigt oder die Proteine zur weiteren Verwendung anaerobisiert werden mussten wurde die Umpufferung mithilfe der NAP-5 bzw. NAP-25 (GE Healthcare, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.7.14 Western Blot

Um kleinste Proteinmengen sensitiv nachweisen zu können wurden die Proteine nach einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) mithilfe des Transblot Turbo (Bio-Rad, Deutschland) übertragen. Dafür wurde zuerst die Membran in Methanol für 10 min äquilibriert und anschließend in Towbin-Puffer für den Blot vorbereitet. Das SDS-Gel wurde ebenfalls in Towbin-Puffer 15 min inkubiert. Die Membran wurde mitsamt dem aufliegenden Gel zwischen zwei Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei in den Transblot Turbo gelegt und 10 min bei 1 V und 25 mA geblottet. Anschließend wurde das Gel restlos von der Membran entfernt und diese 5 min mit TBS gewaschen. Um freie Bindungsstellen auf der Membran zu besetzen wurde die Membran für 1 h mit Blockierungslösung blockiert. Darauf folgte erneut ein Waschschrift von 5 min mit TBS. Der primäre Antikörper wurde je nach Herstellerangaben verdünnt oder unverdünnt für 1 h bei RT auf der Membran inkubiert. Um die Reste des ungebundenen Antikörpers von der Membran zu waschen erfolgten drei Waschriffe mit TBST von jeweils 10 min und ein weiterer mit TBS von 5 min. Daraufhin wurde der sekundäre Antikörper nach Herstellerangaben verdünnt und auf der Membran für 1 h bei RT inkubiert. Wieder wurde die Membran im Anschluss an die Inkubation dreimal mit TBST für jeweils 10 min gewaschen um die Reste des sekundären Antikörpers zu entfernen. Daraufhin wurde die Membran für die Detektion in APB-Puffer für 5 min

vorbereitet. Die Detektion erfolgte durch die Zugabe der Färbelösung und wurde nach Auftreten einer Färbung mit Wasser abgestoppt.

<u>Towbin-Puffer:</u>	25 mM Tris/HCl pH 9,5 192 mM Glycin 15 % (v/v) Methanol
<u>TBS:</u>	50 mM Tris/HCl pH 7,6 150 mM NaCl
<u>TBST:</u>	TBS mit 0,1 % (v/v) Tween-20
<u>Blockierungslösung:</u>	TBS mit 5 % (w/v) Milchpulver
<u>APB-Puffer:</u>	100 mM Tris/HCl pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
<u>Färbelösung:</u>	20 mL APB-Puffer 132 µL NBT in 70 % (v/v) DMF 33 µL BCIP in 100 % (v/v) DMF
<u>Primärer Antikörper:</u>	5-33 µg/mL αNirN in TBS (1E11 IgM)
<u>Sekundärer Antikörper:</u>	αMaus IgM in TBS (1:2500 verd.)

3.7.15 Extraktion von Tetrapyrrolen

Um die Tetrapyrrole aus Zellen bzw. Proteinen zu gewinnen wurden zunächst, falls noch nicht geschehen, die Zellen mithilfe von Glaskugeln und dem DisruptorGenie für 10 min aufgeschlossen. Um die Tetrapyrrole aus den Proteinen zu lösen bzw. die Proteine zu fällen, folgte die Zugabe von 450 µL Aceton/HCl-Lösung zu 200-300 µL zellfreiem Extrakt und 2 min starkem Durchmischen. Im Anschluss wurden alle Zelltrümmer und denaturierten Proteine für 10 min bei 16.100 xg und 4 °C sedimentiert.

Die Proben wurden je nach Menge der enthaltenen Tetrapyrrole in dem Concentrator plus für 10-20 min eingengt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 5 µL konzentrierter HCl erneut 10 min bei 4 °C und 16.100 xg zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde in HPLC-Probengefäße überführt und direkt für die Chromatographie eingesetzt, da die Proben in extrahierter Form nur wenige Stunden stabil waren.

<u>Aceton/HCl-Lösung:</u>	97,5 % (v/v) Aceton
	2,5 % (v/v) HCl

3.7.16 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Um die zuvor extrahierten Tetrapyrrole untersuchen zu können wurde eine HPLC anhand der etablierten Methode AndrewAQSäuleTTmod durchgeführt. Hierfür wurde eine Reprosil Pur AQ, 5 µm, 150 x 2,1 mm Säule (Dr. Maisch, Deutschland) und das HPLC-System von Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland) eingesetzt. Die Flussrate betrug 0,2 mL/min und die eingesetzten Laufmittel waren:

Laufmittel A:	0,01 % (v/v) Ameisensäure in MilliQ
Laufmittel B:	Acetonitril

Der folgende Gradient wurde für die Trennung eingesetzt:

00 min:	95 % Laufmittel A und 5 % Laufmittel B
00-06 min:	Gradient auf 80 % Laufmittel A und 20 % Laufmittel B
06-25 min:	Gradient auf 70 % Laufmittel A und 30 % Laufmittel B
25-30 min:	Gradient auf 0 % Laufmittel A und 100 % Laufmittel B
30-40 min:	Halten 0 % Laufmittel A und 100 % Laufmittel B
40-45 min:	Gradient auf 95 % Laufmittel A und 5 % Laufmittel B
45-55 min:	Halten 95 % Laufmittel A und 5 % Laufmittel B

Während des gesamten Laufes wurde ein UV/Vis-Spektrum von 250 nm bis 750 nm aufgenommen. Die Tetrapyrrole wurden mittels Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 385 nm und der Emissionswellenlänge von 610 nm untersucht.

Um das Substratanalogon mittels HPLC nachzuweisen musste aufgrund der geringen Hydrophobizität des Analogons eine neue Methode etabliert werden. Hierzu kam eine Equisil BDS C18-2, 5 μ m, 250 x 4,6 mm Säule (Dr. Maisch, Deutschland) bei einer Flussrate von 0,5 mL/min und folgenden Laufmitteln zum Einsatz.

Laufmittel A: 1 M Ammoniumacetat pH 5,2

Laufmittel B: Methanol

Laufmittel C: Acetonitril

Es wurde folgender Gradienten eingesetzt:

00-10 min: 90 % Laufmittel A und 10 % Laufmittel C

10-25 min: Gradient auf 0 % Laufmittel A, 90 % Laufmittel B und 10 % Laufmittel C

25-40 min: Halten 0 % Laufmittel A, 90 % Laufmittel B und 10 % Laufmittel C

40-45 min: Gradient auf 90 % Laufmittel A und 10 % Laufmittel C

45-55 min: Halten 90 % Laufmittel A und 10 % Laufmittel C

Auch in diesem Fall wurden das UV/Vis-Spektrum und die Fluoreszenz mit denselben Detektoreinstellungen wie oben, aufgezeichnet.

3.7.17 Massenspektrometrie

Die HPLC Trennung der Tetrapyrrole erfolgte wie zuvor in Kapitel 3.7.16 beschrieben und die Massen der eluierten Tetrapyrrole wurden mittels ESI-MS an einem LTQ XL linear ion trap Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) im positiven Ionen Modus gemessen. Dies erfolgte in Kooperation mit Alexander Neumann und Michael Maczka vom Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig.

3.7.18 *In vivo* Enzymaktivitätstest

Der *in vivo* Enzymaktivitätstest wurde durchgeführt, um zu untersuchen ob NirDL aus *H. thermophilus*, NirDLGH aus *P. aeruginosa* oder die Dimere NirDL und NirGH in der Lage sind das Substrat Sirohäm umzusetzen.

Hierzu wurden *E. coli* BL21-Zellen mit einem Plasmid, welches das *cysG*-Gen (pETDuet*cysG* oder pBCM*cysG6*) enthielt und einem Plasmid, welches die Gene der zu untersuchenden Proteine, trug transformiert. Ausgehend von einer Vorkultur wurden 120 mL LB-Medium in einer Anaerobenflasche oder 100 mL LB-Medium in einem 100 mL-Erlenmeyerkolben ohne Schikane 1:100 inokuliert. Das Medium wurde zusätzlich mit entsprechendem Antibiotikum und 20 mM NaNO₃ versetzt. Diese Ansätze wurden bei 37 °C und 100 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0,25-0,3 inkubiert und im Anschluss mit 0,01 % (w/v) Arabinose und 500 µM IPTG induziert. Die weitere Inkubation erfolgte dann bei 25 °C bzw. 17 °C über Nacht. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Zellen bei 4000 x g für 15 min und 4 °C sedimentiert und im Anschluss in TBS (siehe 3.7.14) aufgenommen und mittels erneuter Zentrifugation sedimentiert. Zur Untersuchung der enthaltenen und umgesetzten Tetrapyrrole wurden im Anschluss eine Tetrapyrrolextraktion (siehe 3.7.15) und eine HPLC-Analyse (siehe 3.7.16) durchgeführt.

3.7.19 Sirohäm-Decarboxylase-Aktivitätsassay

Der Enzymaktivitätstest wurde unter anaeroben Bedingungen in einem Anaerobenzelt (Coy Laboratories, Grass Lake, USA) durchgeführt. Die Zellen, welche das Substrat Sirohäm (siehe 3.7.5) enthielten, wurden in Enzymtestpuffer resuspendiert, aliquotiert und mithilfe von Glaskugeln und einem Zelldisruptor für 10 min aufgeschlossen. Für den Enzymtest wurden 150 µL des zellfreien Extraktes ohne Glaskugeln in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit 10 µM, 20 µM oder 40 µM gereinigtem Protein vermischt. Der Gesamtansatz betrug 250 µL pro Probe. Sollte das Protein NirDL aus *H. thermophilus* untersucht werden wurde der Ansatz für 2 h bei 60 °C oder über Nacht bei 40 °C inkubiert. Bei einem Ansatz der NirDL-Varianten aus *H. thermophilus* wurden diese 2 h bei 60 °C und die Proteine NirDLGH aus *P. aeruginosa* 6 h bei 37 °C inkubiert. Außerdem wurde ein weiterer Inkubationszeitraum gewählt bei dem nach 3 h Inkubation mit NirDL_{P.a.} für weitere 3 h NirGH_{P.a.} hinzugefügt wurden. Die Temperatur wurde konstant auf 37 °C gehalten. Zusätzlich wurden Tests mit NirDLGH_{P.a.} und DNA-Abschnitten, welche dem hypothetischen Bindungsbereich vor dem *nirJ* entsprachen, durchgeführt. Dazu wurden dem Test 50 nM oder 500 nM DNA hinzugefügt.

Der Enzymaktivitätstest zur Überprüfung der Umsetzung des Substratanalogons wurde ebenso durchgeführt wie für NirDL_{H.th.} beschrieben. Hier wurde anstatt des zellfreien Extraktes 20 µM Fe-UroIII eingesetzt.

<u>Enzymtestpuffer:</u>	50 mM Tris/HCl pH 7,5
	300 mM NaCl
	5 % (v/v) Glycerin

3.7.20 UV/Vis-Spektroskopie

Mittels UV/Vis-Spektroskopie wurde die Bindung des Substratanalogons Fe-UroIII an das Protein NirDL_{H.th.} und die gereinigten Varianten untersucht. Aufgrund der Verschiebung der Absorptionsmaxima kann diese Bindung nachgewiesen werden. Hierfür wurden unter anaeroben Bedingungen in einem Anaerobenzelt 10 µM gereinigtes Protein mit 10 µM Fe-UroIII vermischt und auf ein Gesamtvolumen von 100 µL mit Enzymtestpuffer (siehe 3.7.19) aufgefüllt und sofort in einer 1 cm Quarzküvette vermessen. Die Messungen wurden an einem V650-Spektroskop (Jasco, Deutschland) über einen Wellenlängenbereich von 250-800 nm, durchgeführt.

3.7.21 Proteinkristallisation

Für die Kristallisationsversuche wurde das mittels Gelpermeationschromatographie gereinigte Fusionsprotein NirDL aus *H. thermophilus* eingesetzt. Das Protein in seiner apo-Form und als Co-Komplex mit Fe-UroIII wurden als SeMet-Derivate mit der *sitting drop vapor diffusion*-Methode (Guerrero *et al.*, 2001) kristallisiert. Das apo-Protein wurde mit 7 mg/mL in gleichen Volumina mit der Präzipitationslösung I versetzt und bei 19 °C bis zu zwei Wochen inkubiert. Für die Kristallisation des Co-Komplexes wurde zunächst gereinigtes Protein (7 mg/mL) mit 0,5 mM Fe-UroIII für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz zu gleichen Volumina zu der Präzipitationslösung II gegeben.

<u>Präzipitationslösung I:</u>	19 % (w/v) PEG 3350
	0,1 M Natriumcitrat pH 5,6
	0,18 M LiCl
	6,7 mM 4-Aminobenzoesäure

Präzipitationslösung II:

27 % (v/v) MPD

0,1 M MES pH 5,5

9,95 mM Spermidin

Die erhaltenen Kristalle erhielten einen Cryo-Schutz mit 25-33 % (v/v) Glycerin oder 33 % (v/v) MPD bevor sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden.

Die SAD-Datensätze der apo-NirDL wurden in der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY, Berlin, Deutschland) an der beamline 14.1 und an der P11 beamline der PETRA-III (DESSY, Hamburg, Deutschland) gemessen. Der beste Datensatz für den Co-Komplex stammte aus dem HZI Braunschweig mit einem Rigaku Röntgengenerator, ausgestattet mit einem Saturn 944+ Detektor (Rigaku, Sevenoaks, UK).

Die gesamten Kristallisationsexperimente, Verfeinerungen und Strukturaufklärung wurden am HZI Braunschweig von Dr. Stefan Schmelz und Theresa Kriegler, Abteilung für Molekulare Strukturbiologie, durchgeführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 NirDLGH aus *P. aeruginosa* als Transkriptionsregulator

Wie unter Kapitel 1.6.5 beschrieben sind die Proteine NirDLGH als Transkriptionsregulatoren annotiert. Diese potentielle Aktivität wird in dem folgenden Kapitel genauer untersucht.

4.1.1 Analyse der NirDLGH- und IHF-Bindestelle mittels Reportergenkonstrukten in *P. aeruginosa*

Im Rahmen der Dissertation von Johannes Walther (Johannes Walther, 2011) wurde gezeigt, dass sich ein weiterer Transkriptionsstartpunkt, zusätzlich zu dem am Start des *nir*-Operons, *upstream* des *nirJ*-Gens befindet. Außerdem konnten mittels DNA-Bandshifts, DNA-Footprints und bioinformatischen Analysen eine NirDLGH-Bindestelle postuliert sowie ein mögliches Bindemotiv für den *integration host factor* (IHF) identifiziert werden (CAACCTGTT).

Der IHF ist ein Histon-ähnliches, ca. 10 kDa großes Heterodimer, das aus den Proteinen HimA und HimB aufgebaut ist. Der IHF unterstützt bei vielen Prozessen die Bildung des Initiationskomplexes sowie die Biegung der DNA und leitet damit die Transkription bestimmter Gene ein (Swinger and Rice, 2003).

Aufbauend auf den Arbeiten von Johannes Walther sollte in dieser Arbeit der Einfluss des IHF-Bindemotivs und der putativen NirDLGH-Bindestelle auf die Regulation der nachfolgenden *nirJEN*-Gene mittels *lacZ*-Reportergenfusionen untersucht werden. Die Reportergenkonstrukte bestanden aus dem Vektor mini-CTX-*lacZ*, in den Fragmente unterschiedlicher Länge des putativen *nirJ*-Promotors kloniert waren. Die *nirJ*-Promotorfragmente wurden vor das promotorlose *lacZ*-Gen des Vektors kloniert. Die Abbildung 11 stellt die von Johannes Walther erstellten, unterschiedlichen Konstrukte schematisch dar. Das Konstrukt JW4 enthielt den unveränderten Promotorbereich von -124 bp bis +42 bp ausgehend vom *nirJ*-Transkriptionsstart und umfasst damit die IHF-Bindesequenz im Bereich -124 bp bis -64 bp sowie die NirDLGH-Bindestelle von -64 bp bis +42 bp. Das Konstrukt JW9 war ähnlich aufgebaut, lediglich der Bereich der NirDLGH-Bindestelle war um 28 bp kürzer und reichte bis zu +14 bp. JW10 enthielt die NirDLGH-Bindestelle bis +14 bp, wohingegen die IHF-Region fehlte. Das

Konstrukt JW6 beinhaltet ebenfalls nur die NirDLGH-Bindestelle bis +14 bp, wobei diese mutiert war (TCNNNGA zu GTNNNAC).

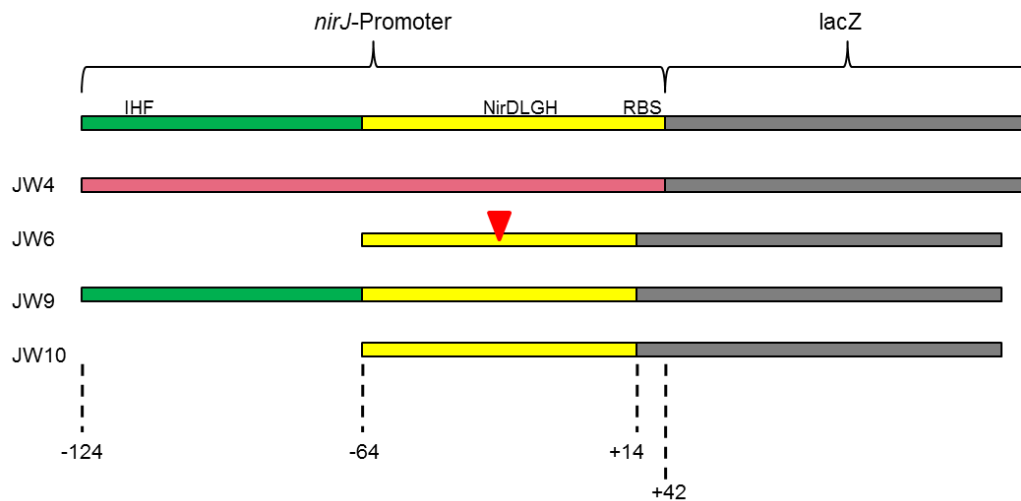


Abbildung 11: Schematische Darstellung der untersuchten *nirJ*-Promotor/Reportergenkonstrukte. Das Konstrukt JW4 enthält die unveränderte Sequenzabfolge von -124 bp bis +42 bp ausgehend vom Transkriptionsstart des *nirJ*-Gens und diente als Positivkontrolle. JW9 enthält die IHF-Binderegion (grün) von -124 bp bis -64 bp und die NirDLGH-Binderegion (gelb) von -63 bp bis +14 bp. Bei JW6 fehlt die IHF-Binderegion und die postulierte NirDLGH-Binderegion ist mutiert. JW10 ist ebenso aufgebaut, nur das die NirDLGH-Binderegion ohne Mutation eingebracht wurde. Direkt hinter dem eingebrachten Promotorfragment befindet sich bei allen Konstrukten das *lacZ*-Gen des Vektors (grau).

Die unterschiedlichen Reportergenkonstrukte wurden mittels biparental Mating in den Stamm *P. aeruginosa* PAO1 eingebracht und über die im Vektor vorhandene *attB*-Rekombinationsstelle in das Genom integriert. Die resultierenden Stämme wurden durch eine anaerobe Wachstumskurve auf ihr Wachstum und durch Probenahme zum Zeitpunkt der mittleren exponentiellen Phase und anschließendem β -Galactosidase Enzymtest, auf ihre Promotoraktivität hin untersucht worden. Die Ergebnisse der untersuchten Stämmen PAO1JW6, PAO1JW9 und PAO1JW10 wurden mittels Positivkontrolle PAO1JW4 und zwei Negativkontrollen KS11 und PAO1JW0 überprüft. Beide Negativkontrollen enthielten das promotorlose, in das *P. aeruginosa*-Genom integrierte, *lacZ*-Gen.

Der Verlauf des Wachstums der einzelnen Stämme ist in Abbildung 12 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich das Wachstum der Stämme abhängig von ihren integrierten Reportergenkonstrukten nicht deutlich unterscheidet. Die Negativkontrollen KS11 und PAO1JW0, welche kein Promotorfragment vor dem *lacZ*-Gen besitzen, wachsen innerhalb der ersten 8 Stunden ebenso wie die anderen Stämme. Lediglich die optische Dichte des Stammes PAO1JW0 liegt nach 24 Stunden leicht über dem Durchschnitt. Diese Schwankungen lagen jedoch im normalen Rahmen des Wachstums bei der

Erstellung der Wachstumskurven. Ebenso ist das etwas geringere Wachstum des Stammes PAO1JW6 auf normale Schwankungen zurückzuführen.

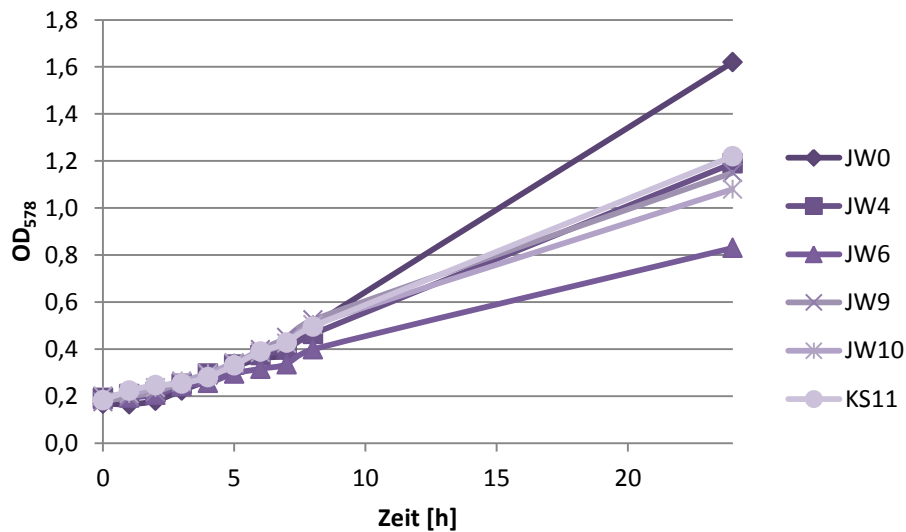


Abbildung 12: Wachstumskurven von *P. aeruginosa* PAO1-Stämmen mit verschiedenen Reportergergenkonstrukten.

Aufgetragen ist die optische Dichte bei 578 nm gegen die Zeit in Stunden. Die Stämme PAO1JW0 (JW0) und KS11 sind Negativkontrollen, PAO1JW4 (JW4) diente als Positivkontrolle und die Stämme PAO1JW6 (JW6), PAO1JW9 (JW9) und PAO1JW10 (JW10) enthielten verschiedene Längen des *nirJ*-Promotors. Das geringe Wachstum ist auf die Nutzung des AB-Mediums und Inokulation von OD_{578} 0,2 zurückzuführen.

In Abbildung 13 sind die Bestimmungen der Promotoraktivitäten in den unterschiedlichen Stämmen über einen β -Galactosidase Enzymtest, in Bezug zur Negativkontrolle (PAO1JW0) dargestellt. Hierbei wurde die Aktivität, die in Miller Units gemessen wird, im Stamm PAO1JW0 auf 100 % gesetzt und die Aktivitäten in den anderen Stämmen im Vergleich dazu berechnet.

Deutlich zu erkennen ist, dass in der Positivkontrolle PAO1JW4 eine bis zu 300 % höhere Aktivität als in der Negativkontrolle PAO1JW0 vorlag. In den Stämmen PAO1JW6 und PAO1JW10, deren Reportergergenkonstrukte nicht das IHF-Bindemotiv enthalten, war eine ähnliche Aktivität zu detektieren, wie in der Negativkontrolle. Der Stamm PAO1JW6 enthielt zusätzlich noch eine Mutation in der NirDLGH-Binderegion. Es war aber kein Unterschied in der Aktivität in den drei Stämmen zu erkennen. In der zweiten Negativkontrolle KS11, die ebenso wie der Stamm PAO1JW0 das promotorlose *lacZ*-Gen enthielt, zeigte sich eine Aktivität von 120 % im Vergleich zu PAO1JW0. In dem Stamm PAO1JW9, der ebenfalls als Positivkontrolle fungieren sollte, zeigte sich kein großer Unterschied in der Aktivität zu den anderen Stämmen und den Negativkontrollen. Diese lag bei etwa 110 % bis 160 % im Vergleich zu PAO1JW0.

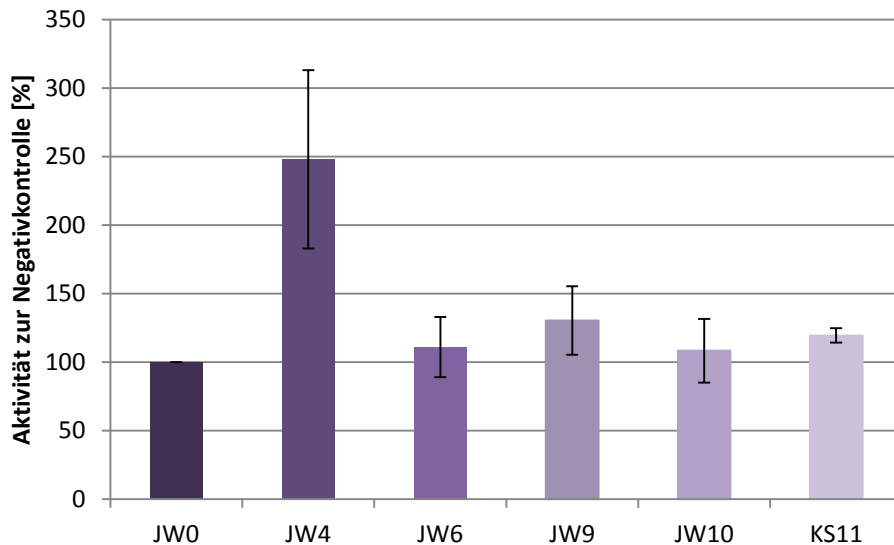


Abbildung 13: β -Galactosidaseaktivität der verschiedenen Reportergenkonstrukte im Vergleich zur Negativkontrolle PAO1JW0.

Die Aktivität in den Stämmen in Miller Units im Vergleich zum Stamm PAO1JW0 (JW0), der eine Negativkontrolle darstellt. Die Aktivität in dem Stamm PAO1JW0 wurde auf 100 % gesetzt und die Aktivitäten der Stämme PAO1JW4 (JW4) diente als Positivkontrolle, PAO1JW6 (JW6), PAO1JW9 (JW9), PAO1JW10 (JW10) sowie die zweite Negativkontrolle KS11, wurden daraus berechnet. Zusätzlich sind die Standardabweichungen für jeden Stamm angegeben (n = 4).

Der Unterschied der beiden Stämme PAO1JW4 und PAO1JW9 besteht in 28 bp im Bereich +14 bp bis +42 bp ausgehend vom *nirJ*-Transkriptionsstart. PAO1JW4 ist um diese 28 bp länger als PAO1JW9. In diesem Bereich befindet sich die vorhergesagte Ribosomenbindestelle (RBS) des *nirJ*-Gens. Weil das nachgelagerte *lacZ*-Gen allerdings eine eigene Ribosomenbindestelle besitzt, wurde dieser Bereich für die Transkription als unwichtig erachtet und die Konstrukte verkürzt. Durch die deutlichen Unterschiede in den Aktivitäten zeigte sich aber, dass diese 28 bp wichtiger sind als zunächst vermutet. Es wäre möglich, dass durch die Verkürzung die DNA nicht mehr ausreichend gebogen werden kann und sich somit kein Initiationskomplex mit der RNA-Polymerase ausbildet. Außerdem wäre es auch denkbar, dass NirDLGH als Regulator nicht mehr in der Lage ist an die DNA zu binden um die Transkription zu regulieren. Zusätzlich wäre es ebenso möglich, dass es zwar zur Transkription kommt, aber durch inkorrekte Abstände zwischen Transkriptionsstart und RBS die Translation nicht stattfindet.

Für weitere Untersuchungen würden sich zusätzliche Studien mit unterschiedlich verkürzten Reportergenkonstrukten anbieten, um die Rolle der 28 bp einzuschätzen. Außerdem wäre es wichtig, das zweite Transkript nachzuweisen, welches aufgrund des zusätzlichen Transkriptionsstarts vor dem *nirJ*-Gen vorhanden sein müsste. Damit

könnte auch untersucht werden, an welchem Punkt die Bildung der β -Galactosidase fehlgeschlagen ist.

4.1.2 Der Einfluss von NirL und NirH auf die Promotoraktivität der *nirJEN*-Gene

Um die Rolle von NirL und NirH für die Regulation des *nirJ*-Promotors genauer zu untersuchen, wurden die Deletionsmutanten PAO1 Δ *nirL* und PAO1 Δ *nirH* mit dem Reporter-genkonstrukt pJW4 versehen. Dieser Vektor diente zur Integration des Reportergens *lacZ* ins Genom. Vor dem *lacZ*-Gen befand sich die *nirJ*-Promotorregion von -124 bp bis +42 bp ausgehend vom *nirJ*-Transkriptionsstart (siehe Abbildung 10).

Die PAO1-Deletionsmutanten Δ *nirL* und Δ *nirH* wurden ausgewählt, weil Johannes Walther in seiner Arbeit zeigen konnte, dass die Proteine NirL und NirH in Gelretardationsanalysen in der Lage waren an die DNA *upstream* des *nirJ*-Gens zu binden. Wohingegen die Proteine NirD und NirG einzeln dazu nicht in der Lage waren (Johannes Walther, 2011).

Zusätzlich zu den Deletionsmutanten wurde ebenfalls der *P. aeruginosa* Wildtyp-Stamm PAO1 mit dem Reporter-genkonstrukt pJW4 versehen und diente als Positivkontrolle. Die folgenden Experimente wurden mit Hilfe von Timo Kohn und Sarah Ressel durchgeführt (Timo Kohn, 2013; Sarah Ressel, 2013).

Die Deletionsmutanten PAO1 Δ *nirL*JW4 und PAO1 Δ *nirH*JW4 wiesen ein deutlich verringertes Wachstum als der Wildtypstamm auf. Es ist davon auszugehen, dass durch die Deletion im Genom nur NirDGH bzw. NirDLG produziert wird, wodurch der Kofaktor Häm d_1 nicht gebildet werden kann. In dem Fall würde der zweite Schritt der Denitrifikation von Nitrit zu Stickstoffmonoxid nicht katalysiert werden und das Wachstum der Zellen, im Vergleich zum Wildtyp, gehemmt sein. Ein geringes Wachstum der Zellen war zu erkennen, was vermutlich auf den verbleibenden ersten Schritt zur Energiegewinnung der Denitrifikation von Nitrat zu Nitrit zurückzuführen ist. Dieser Einfluss der Deletion von *nirL* bzw. *nirH* sollte nun durch die Plasmid-vermittelte Produktion von NirL bzw. NirH komplementiert werden.

Die Komplementierung der Deletionsmutanten wurde zunächst mithilfe der Vektoren pUCP20*TnirL* für den Stamm PAO1 Δ *nirL*JW4 und pUCP20*TnirH* für den Stamm PAO1 Δ *nirH*JW4 untersucht. Hierbei zeigte sich allerdings dasselbe verringerte anaerobe Wachstum, welches auch die Deletionsstämme ohne Komplementationsvektor aufwiesen (siehe Abbildung A1 im Anhang). Die Vektor-basierte Produktion von NirL

oder NirH aufgrund eines Vektors scheint nicht auszureichen um die enzymatische Funktion von NirDLGH wieder auszugleichen.

Vermutlich ist das Vektor-basiert gebildete NirL bzw. NirH nicht in der Lage den Komplex mit den anderen Proteinen zu NirDLGH zu vervollständigen, da sowohl NirL als auch NirH Homodimere ausbilden kann und damit keinen Komplex mit den anderen Proteinen eingeht.

Um dies zu vermeiden, wurden weitere Komplementationsversuche unternommen. Hierbei wurde in den Deletionsstamm PAO1 Δ nirLJW4 der Vektor pUCP20TnirDLGH eingebracht. Zusätzlich wurden der Stamm PAO1JW4 als Positivkontrolle und der Deletionsstamm PAO1 Δ nirLJW4 untersucht. Alle Stämme haben das Reportergenkonstrukt bestehend aus nirJ-Promotorregion und lacZ-Gen im Genom integriert.

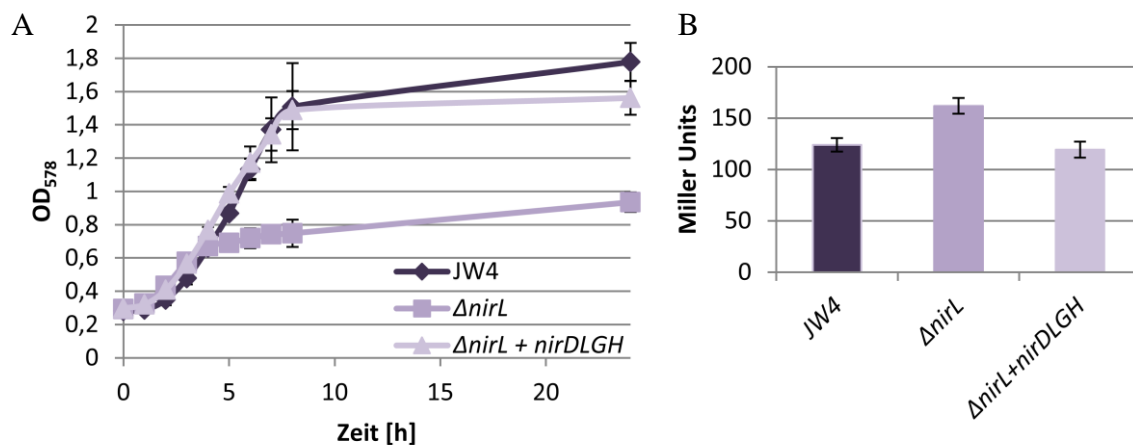


Abbildung 14: A: Anaerobe Wachstumsuntersuchung der *P. aeruginosa*-Deletionsmutante PAO1 Δ nirLJW4 sowie der komplementierten Mutante PAO1 Δ nirLJW4+pUCP20TnirDLGH und des Positivkontrollstamms PAO1JW4. B: β -Galactosidase Enzymaktivitätstest für die *P. aeruginosa*-Deletionsmutante PAO1 Δ nirLJW4 sowie der komplementierten Mutante PAO1 Δ nirLJW4+pUCP20TnirDLGH und des Positivkontrollstamms PAO1JW4.

A: Der Stamm PAO1JW4 (JW4) diente als Positivkontrolle und enthielt, analog zu allen untersuchten Stämmen, das Reportergenkonstrukt, welches aus nirJ-Promotor und lacZ-Gen bestand. Der Stamm PAO1 Δ nirL_JW4 (Δ nirL) besaß eine Deletion des nirL-Gens und im Stamm PAO1 Δ nirL_JW4+pUCP20TnirDLGH (Δ nirL+nirDLGH) war dieses Gen ebenfalls deletiert. Dieser Stamm enthielt zusätzlich noch den Vektor pUCP20TnirDLGH, wodurch die Deletion komplementiert werden sollte. Aufgetragen ist die optische Dichte bei 578 nm gegen die Zeit in Stunden. B: Aufgetragen ist die Aktivität in Miller Units für die Stämme PAO1JW4, der Deletionsmutante PAO1 Δ nirLJW4 sowie der komplementierten Mutante PAO1 Δ nirLJW4+pUCP20TnirDLGH mit den jeweiligen Standardabweichungen (n = 3) (Sarah Ressel, 2013).

In der anaeroben Wachstumskurve in Abbildung 14A ist zu erkennen, dass alle drei Stämme PAO1JW4, PAO1 Δ nirLJW4 und PAO1 Δ nirLJW4+pUCP20TnirDLGH innerhalb der ersten 4 Stunden ein ähnliches Wachstumsverhalten aufwiesen. Es begann mit einer lag-Phase innerhalb der ersten 1-1,5 Stunden, gefolgt von der log-Phase. Die

log-Phase endete im Falle des Deletionsstammes bereits nach 4-5 Stunden, wohingegen die des Positivkontrollstamms PAO1JW4 und der komplementierten Mutante PAO1 Δ *nirL*JW4+pUCP20*TnirDLGH* erst nach 7-8 Stunden endete. Die Deletionsmutante befand sich zwischen 5 und 24 Stunden in der Stationärphase, die bei den anderen beiden Stämmen erst zwischen 8 und 24 Stunden zu beobachten war. Aufgrund der Deletion des *nirL*-Gens scheint, wie oben beschrieben, der Stamm nicht in der Lage zu sein, den zweiten Schritt der Denitrifikation zu katalysieren und aufgrund dessen kam es zu einem verminderten Wachstum des Stammes.

Die komplementierte Mutante hingegen zeigte dasselbe Wachstumsverhalten wie der Positivkontrollstamm ohne Deletion im Genom, sodass die Komplementation erfolgreich war und vermutlich die gesamten Schritte der Denitrifikation katalysiert werden konnten.

Die Abbildung 14B zeigt die Auswertung des β -Galactosidase Enzymaktivitätstests für die einzelnen Stämme. Die Aktivität für den Stammes PAO1JW4, der nur das Reportergenkonstrukt im Genom trug und ansonsten dem Wildtyp entsprach, lag im Bereich von ca. 125 Miller Units. Interessanterweise lag die Aktivität für die Deletionsmutante PAO1 Δ *nirL*JW4 mit um die 160 Miller Units über der Aktivität für den Positivkontrollstamm. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Anwesenheit von NirL eine leicht reprimierende Wirkung auf die Expression der nachfolgenden *nirJEN*-Gene hat und diese nun aufgrund des Fehlens von NirL ausbleibt. Ebenso denkbar wäre aber auch, dass durch die Abwesenheit von NirL Sirohäm nicht zu 12,18-Didecarboxy-Sirohäm umgesetzt werden kann. Dabei sammelt sich Sirohäm in der Zelle an, Häm d_1 wird nicht gebildet und eine weitere Feedbackregulation regelt die Produktion der für die Häm d_1 -Biosynthese wichtigen Proteine hoch. Die Aktivität für die komplementierte Mutante PAO1 Δ *nirL*JW4+pUCP20*TnirDLGH* lag mit ca. 120 Miller Units im Bereich des Positivkontrollstamms, sodass ebenso wie im Wachstumsverhalten, auch die Komplementation auf regulatorischer Ebene erfolgreich war.

Da die Komplementation des Stamms PAO1 Δ *nirH*JW4 mit der Produktion von NirH ebenso wenig erfolgreich war wie im Falle von PAO1 Δ *nirL*JW4 und NirL wurde auch für diesen Stamm die Komplementation mit NirDLGH untersucht.

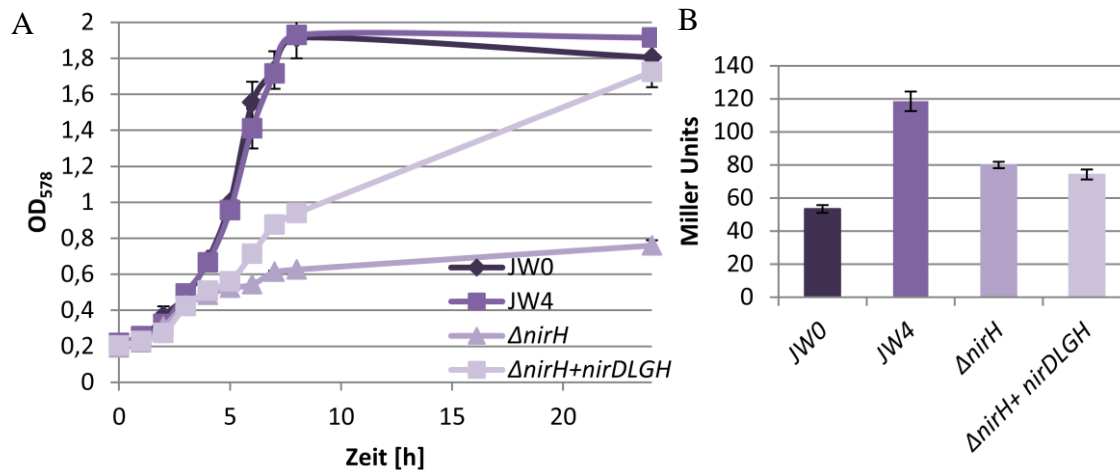


Abbildung 15: A: Anaerobe Wachstumsuntersuchung der *P. aeruginosa*-Deletionsmutante PAO1 $\Delta nirHJW4$ sowie der komplementierten Mutante PAO1 $\Delta nirHJW4+pUCP20TnirDLGH$, des Positivkontrollstamms PAO1JW4 und des Negativkontrollstamms PAO1JW0. B: β -Galactosidase Enzymaktivitätstest für die *P. aeruginosa*-Deletionsmutante PAO1 $\Delta nirHJW4$ sowie der komplementierten Mutante PAO1 $\Delta nirHJW4+pUCP20TnirDLGH$, des Positivkontrollstamms PAO1JW4 und des Negativkontrollstamms PAO1JW0.

A: Der Stamm PAO1JW4 (JW4) diente als Positivkontrolle und enthielt, analog zu allen untersuchten Stämmen bis auf JW0, das Reportergenkonstrukt, welches aus *nirJ*-Promotor und *lacZ*-Gen besteht. PAO1JW0 (JW0) ist der Negativkontrollstamm und trug das promotorlose *lacZ*-Gen im Genom. Der Stamm PAO1 $\Delta nirHJW4$ ($\Delta nirH$) besaß eine Deletion des *nirH*-Gens und im Stamm PAO1 $\Delta nirHJW4+pUCP20TnirDLGH$ ($\Delta nirH+nirDLGH$) war dieses Gen ebenfalls deletiert. Dieser Stamm enthielt zusätzlich noch den Vektor pUCP20*TnirDLGH*, wodurch die Deletion komplementiert werden sollte. Aufgetragen ist die optische Dichte bei 578 nm gegen die Zeit in Stunden. B: Aufgetragen ist die Aktivität in Miller Units für die Stämme PAO1JW0 (JW0), PAO1JW4 (JW4), der Deletionsmutante PAO1 $\Delta nirHJW4$ ($\Delta nirH$) sowie der komplementierten Mutante PAO1 $\Delta nirHJW4+pUCP20TnirDLGH$ ($\Delta nirH+nirDLGH$) mit den jeweiligen Standardabweichungen ($n = 3$).

In Abbildung 15A sind die Ergebnisse der anaeroben Wachstumsuntersuchungen dargestellt. Ebenso wie bei der vorher beschriebenen Deletionsmutante $\Delta nirL$ zeigten die untersuchten Stämme PAO1JW0, PAO1JW4, PAO1 $\Delta nirHJW4$ und PAO1 $\Delta nirHJW4+pUCP20TnirDLGH$ innerhalb der ersten 4 Stunden ein ähnliches Wachstumsverhalten. Danach ging die Deletionsmutante PAO1 $\Delta nirHJW4$ in die Stationärphase über, die bis 24 Stunden anhielt. Die Stämme PAO1JW0, der das promotorlose *lacZ*-Gen im Genom trug und PAO1JW4 setzten die *log*-Phase bis Stunde 8 fort, bevor sie dann in die Stationärphase eintraten. Das Wachstum der komplementierten Mutante PAO1 $\Delta nirHJW4+pUCP20TnirDLGH$ begann nach 4-5 Stunden ebenfalls geringer zu werden. Allerdings stellte sich nicht die Stationärphase ein wie im Falle der Deletionsmutante. Nach 24 Stunden hatte die komplementierte Mutante dieselbe optische Dichte wie die beiden Stämme PAO1JW0 und PAO1JW4 erreicht. Die Komplementation des Wachstumsverhaltens der Mutante schien nur teilweise mit dem Vektor pUCP20*TnirDLGH* möglich zu sein. Denkbar

wäre, dass die Produktion der rekombinanten Proteine nicht schnell genug eingetreten ist, da diese nicht induziert wurden, sondern die basale Expression als ausreichend angenommen wurde. Außerdem wäre es möglich, dass das Fehlen von NirH weitere Effekte zusätzlich zur ausbleibende Produktion des Kofaktors Häm d_1 und zum Einfluss auf die Regulation der folgenden *nirJEN*-Gene hat, wie z.B. polare *downstream* Effekte. In Abbildung 15B sind die entsprechenden Ergebnisse des β -Galactosidase Aktivitätstests gezeigt. Der Stamm PAO1JW0, diente als Negativkontrolle und stellte die basale Expression der β -Galactosidase mit ca. 50 Miller Units dar. Die Aktivität für den Positivkontrollstamm PAO1JW4 lag bei etwa 120 Miller Units und die für die Deletionsmutante bei 80 Miller Units. Damit lag die Aktivität mittig zwischen der Positiv- und der Negativkontrolle. Möglicherweise dienen NirL und NirH als Gegenspieler, also als Repressor und Aktivator. In diesem Fall würde das Fehlen von NirH dazu führen, dass NirL im Überschuss vorliegt und die Expression des *lacZ*-Gens in diesem Versuch reprimiert ist.

Die Aktivität für die komplementierte Mutante betrug, wie für die Deletionsmutante, circa 80 Miller Units. Ähnlich wie im Wachstumsversuch, war die Komplementation auch auf genregulatorischer Ebene nicht erfolgreich. Denkbar wäre auch hier, dass die Produktion der Proteine NirDLGH vom Vektor das Ergebnis beeinflusst hat, da die Proben für diesen Versuch in der mittleren exponentiellen Phase der Stämme bei 5 Stunden genommen wurden. Zu diesem Zeitpunkt unterschied sich auch das Wachstum zwischen der Deletionsmutante und der komplementierten Mutante nicht voneinander. Hier wäre es nötig die Untersuchungen zu wiederholen und bei gleichbleibendem Wachstumsverhalten die Probenahme für die Aktivitätstests zu einem späteren Zeitpunkt durchzuführen. Dies war aufgrund des Ausbleibens des Wachstums des Stammes bis zum Ende der vorliegenden Arbeit nicht möglich.

Um polare Effekte der *downstream* gelegenen Gene aufgrund der Deletion im Genom als Ursache für das veränderte Wachstumsverhalten oder genregulatorische Aktivitäten auszuschließen, wurden Proben aus den anaeroben Wachstumsuntersuchungen der Deletionsmutanten PAO1 Δ *nirL*JW4 und PAO1 Δ *nirH*JW4 entnommen. Im Anschluss wurde mittels Westernblot analysiert, ob das Protein NirN, dessen kodierendes Gen das letzte im Operon darstellt, produziert wurde. Dabei konnte für beide Stämme gezeigt werden, dass NirN gebildet worden ist und keine polaren Effekte auftraten (siehe Abbildung A2 im Anhang).

Des Weiteren wurde der Einfluss einer Überproduktion der Proteine NirL und NirH auf die Promotoraktivität im Wildtyp-ähnlichen Stamm PAO1JW4 untersucht. Dabei sollte die Hypothese des reprimierenden bzw. aktivierenden Effekts von NirL bzw. NirH genauer untersucht werden. Dazu wurde der Stamm PAO1JW4 genutzt. Dieser Stamm enthielt in das Genom integriert, die *nirJEN*-Promotorregion vor dem *lacZ*-Gen. Zusätzlich dazu wurde das Plasmid pUCP20*TnirL* bzw. pUCP20*TnirH* in den Stamm eingebracht, was zur Überproduktion von NirL in dem Stamm PAO1JW4+pUCP20*TnirL* und NirH in dem Stamm PAO1JW4+pUCP20*TnirH* führte.

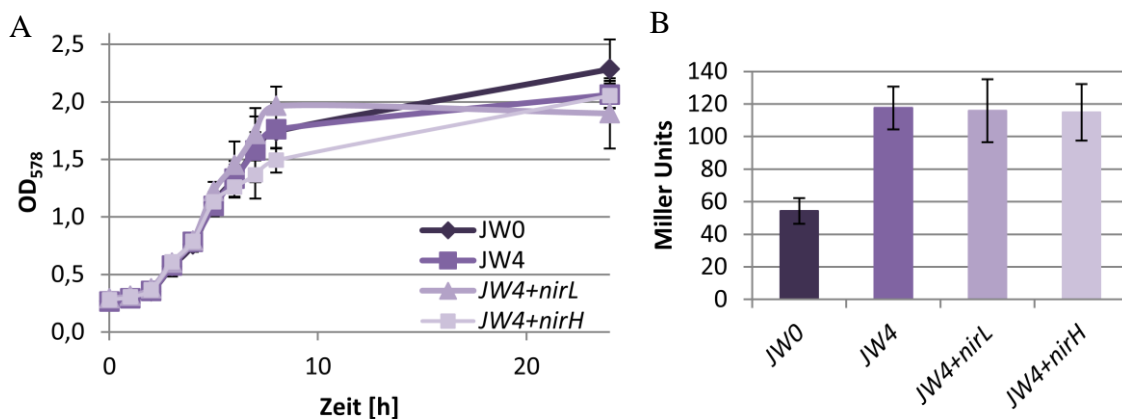


Abbildung 16: A: Anaerobe Wachstumsuntersuchung der *P. aeruginosa*-Stämme PAO1JW0, PAO1JW4, PAO1JW4+pUCP20*TnirL* und PAO1JW4+pUCP20*TnirH* B: β-Galactosidase Enzymaktivitätstest für die *P. aeruginosa*-Stämme PAO1JW0, PAO1JW4, PAO1JW4+pUCP20*TnirL* und PAO1JW4+pUCP20*TnirH*.

A: Der Stamm PAO1JW4 (JW4) diente als Positivkontrolle und enthielt, analog zu allen untersuchten Stämmen bis auf JW0, das Reportergenkonstrukt, welches aus *nirJ*-Promotor und *lacZ*-Gen bestand. PAO1JW0 (JW0) ist der Negativkontrollstamm und trug das promotorlose *lacZ*-Gen im Genom. Der Stamm PAO1JW4+pUCP20*TnirL* (JW4+nirL) besaß den Vektor pUCP20*TnirL*, wodurch NirL zusätzlich zum genomisch kodierten Protein überproduziert wurde. Ebenso wie der Stamm PAO1JW4+pUCP20*TnirH* (JW4+nirH) der den Vektor pUCP20*TnirH* trug, durch den NirH überproduziert wurde. Aufgetragen ist die optische Dichte bei 578 nm gegen die Zeit in Stunden. B: Aufgetragen ist die Aktivität in Miller Units für die Stämme PAO1JW0 (JW0), PAO1JW4 (JW4) sowie für die Stämme zur Überproduktion PAO1JW4+pUCP20*TnirL* (JW4+nirL) und PAO1JW4+pUCP20*TnirH* (JW4+nirH) mit den jeweiligen Standardabweichungen (n = 3).

In Abbildung 16A ist die anaerobe Wachstumskurve der Stämme mit den überproduzierten Proteinen NirL, PAO1JW4+pUCP20*TnirL* (JW4+nirL) und NirH, PAO1JW4+pUCP20*TnirH* (JW4+nirH) sowie die Positiv- (JW4) und Negativkontrollstämme (JW0) dargestellt. Alle Stämme bis auf PAO1JW0 enthielten das Reportergenkonstrukt bestehend aus *nirJ*-Promotor und *lacZ*-Gen im Genom integriert. Der Stamm PAO1JW0 trug das promotorlose *lacZ*-Gen im Genom.

Alle Stämme zeigten innerhalb der ersten 6 Stunden dasselbe Wachstumsverhalten. Lediglich im Bereich der 7. und 8. Stunde war zu erkennen, dass der Stamm PAO1JW4+pUCP20*NirH* etwas früher und der Stamm PAO1JW4+pUCP20*NirL* ein wenig später in die Stationärphase übergingen als die beiden Kontrollstämme PAO1JW0 und PAO1JW4. Diese Unterschiede könnten auf die normalen Schwankungen während des Wachstums zurückzuführen sein. Diese Vermutung wird zusätzlich durch den 24 h-Wert gestützt, da zu diesem Zeitpunkt die optischen Dichten wieder näher beieinander waren und die des Stammes PAO1JW4+pUCP20*NirH* über der des Stammes PAO1JW4+pUCP20*NirL* lag.

In Teil B der Abbildung 16 ist die β -Galactosidase Enzymaktivität für die einzelnen Stämme dargestellt. Die Aktivität für den Negativkontrollstamm PAO1JW0 lag mit etwa 50 Miller Units deutlich unter der für den Positivkontrollstamm mit 120 Miller Units. Allerdings ist auch deutlich zu erkennen, dass weder die Überproduktion von NirL noch von NirH zu einer veränderten genregulatorischen Aktivität führte. Der Grund dafür ist vermutlich nicht, dass NirL und NirH keinen Einfluss auf die Regulation der nachfolgenden *nirJEN*-Gene haben, sondern, dass NirL und NirH vermutlich Homodimere gebildet haben und diese eine geringere Affinität zu der DNA-Bindestelle haben als NirDLGH oder NirDL und NirGH. Die Homodimerbildung konnte in früheren Versuchen von Johannes Walther bereits gezeigt werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Einfluss auf die Promotoraktivität nicht allein auf das übermäßige Vorhandensein oder Fehlen der Proteine NirL und NirH zurückzuführen ist, sondern die Regulation vermutlich über das Fehlen des Kofaktors Häm d_1 in Zusammenspiel mit diesen Proteinen gesteuert wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich bei NirDLGH um Proteine handelt, die an der Feinregulation der nachgeschalteten *nirJEN*-Gene beteiligt sind. Es gibt Anzeichen dafür, dass es sich bei NirL und NirH um Gegenspieler, Repressor und Aktivator, dieser Regulation handeln könnte, dies müsste allerdings noch weiter untersucht werden. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Komplementation der Regulatoraktivität mit den Proteinen NirL oder NirH nicht möglich war, sondern dass hierfür die Proteine NirDLGH notwendig waren. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch die Komplementationsuntersuchungen mit NirDL für die Deletionsmutante PAO1 Δ *nirL*JW4 und NirGH für die Mutante PAO1 Δ *nirH*JW4 um zu untersuchen, ob eventuell das Tetramer NirDLGH oder die Heterodimere NirDL und NirGH einen Einfluss auf die Promotoraktivität haben.

Da aber die Überproduktion von NirL und NirH im Wildtyp-ähnlichen Stamm PAO1JW4 keinen Einfluss auf die Promotoraktivität hatte, ist davon auszugehen, dass die Aktivierung oder Repression der nachfolgenden *nirJEN*-Gene nicht nur auf das Ungleichgewicht zwischen NirL und NirH zurückzuführen ist. Es scheint ein Zusammenspiel aus den Regulatoren und dem Fehlen des Kofaktors Häm d_1 zu sein. Allerdings muss auch dies sowie die Voraussetzung für die Regulation noch weiter untersucht werden. Dabei wäre es ebenso interessant eine $\Delta nirL/\Delta nirH$ -Doppelmutante zu erstellen und deren Einfluss auf die Promotoraktivität zu untersuchen. Dabei könnten genauere Ergebnisse über die Regulation und das Zusammenspiel der Proteine NirL und NirH gewonnen werden.

Zusätzlich hat das Fehlen der Proteine in den Mutanten PAO1 $\Delta nirL$ und PAO1 $\Delta nirH$ nicht nur einen Einfluss auf die genregulatorische Funktion, sondern auch auf das Wachstum den Zellen. Daher wurde im Weiteren die enzymatische Funktion der Proteine NirDLGH untersucht und charakterisiert.

4.2 NirDLGH aus *P. aeruginosa* als Sirohäm-Decarboxylase

Wie im Kapitel 4.1, erwähnt hat die Deletion der Gene *nirL* bzw. *nirH* einen Einfluss auf das anaerobe Wachstum von *P. aeruginosa*. Eine wahrscheinliche Erklärung ist die Beteiligung der Proteine NirDLGH an der Häm d_1 -Biosynthese, die durch die Deletion von *nirL* oder *nirH* nicht vollständig ablaufen kann.

Die Proteine NirDLGH aus *Pa. pantotrophus* sind in der Lage Sirohäm (SH) als Substrat zu nutzen, um eine Decarboxylierung der beiden Acetatgruppen an den C12- und C18-Positionen durchzuführen. Dadurch katalysiert der Proteinkomplex die Reaktion zu 12,18-Didecarboxy-Sirohäm (DDSH). Diese Reaktion verläuft über das Intermediat Monodecarboxy-Sirohäm (MDSH). (Bali *et al.*, 2011)

Um diese Reaktion für NirDLGH aus *P. aeruginosa* ebenfalls nachzuweisen wurde zunächst ein *in vivo*-Enzymaktivitätstest etabliert.

4.2.1 *In vivo*-Enzymaktivitätsanalyse für NirDLGH aus *P. aeruginosa*

Die *in vivo*-Enzymaktivitätsanalysen wurden wie in Kapitel 3.7.18 beschrieben durchgeführt. Hierfür wurde ein Plasmid mit dem *cysG*-Gen und ein Plasmid mit den Genen *nirDLGH* in einen *E. coli*-BL21(DE3)-Stamm eingebracht. Ebenso wurde als Kontrolle das Plasmid mit dem *cysG*-Gen alleine in *E. coli* eingebracht. CysG ist eine *S*-Adenosyl-L-Methionin-abhängige Uroporphyrinogen III-Methyltransferase, die sowohl Dehydrogenase- als auch Ferrochelatase-Aktivitäten aufweist und das für den Test wichtige Substrat Sirohäm produziert. Die erhaltenen Stämme wurden unter semi-anaeroben Bedingungen kultiviert, um nach der Ernte die Tetrapyrrole aus den Zellen zu extrahieren (siehe 3.7.15). Im Anschluss wurden die Tetrapyrrole mittels HPLC analysiert (siehe 3.7.16).

In Abbildung 16 sind die HPLC-Chromatogramme der extrahierten Tetrapyrrole aus der Kontrolle, in der nur CysG produziert wurde, dargestellt sowie die aus dem Versuchsansatz, in dem zusätzlich zu CysG NirDLGH vorhanden war.

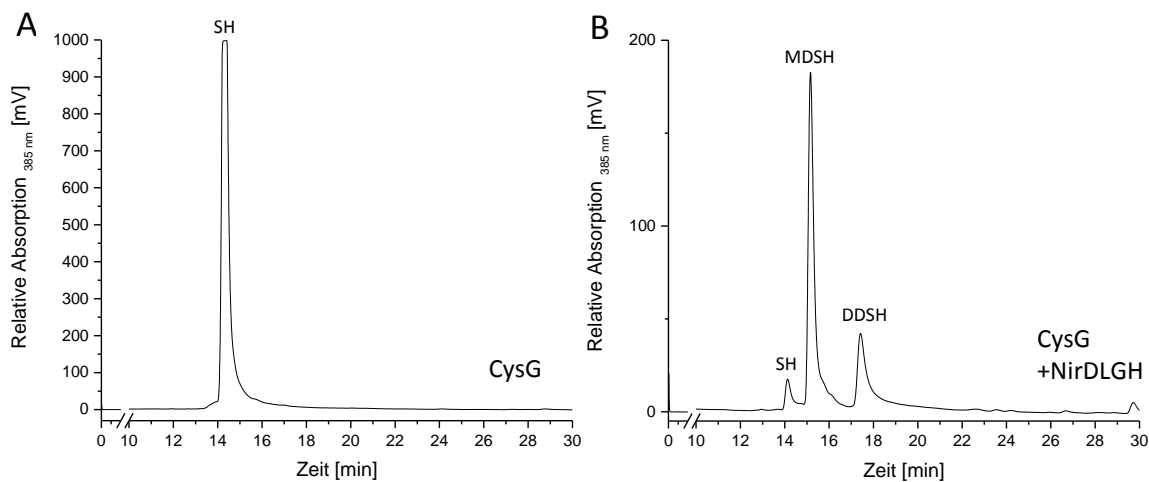


Abbildung 17: Chromatogramme der extrahierten Tetrapyrrole aus den *in vivo*-Enzymaktivitätsanalysen

Chromatographische Analyse der *in vivo*-Enzymaktivität nach der Tetrapyrrolextraktion der Stämme BL21+pETDuet1cysG (A) und BL21+pETDuet1cysG+pACYCnirDLGH (B). Aufgetragen ist die relative Absorption bei 385 nm in Millivolt gegen die Retentionszeit in Minuten. Die Bereiche zwischen 1 und 10 Minuten sowie von 30-51 Minuten sind nicht abgebildet. Markiert sind die höchsten Peaks mit den dazugehörigen Substanzen Sirohäm (SH), Monodecarboxy-Sirohäm (MDSH) und 12,18-Didecarboxy-Sirohäm (DDSH).

Die Abbildung 17A zeigt die chromatographische Analyse der Tetrapyrrole aus dem Stamm BL21+pETDuet1cysG in dem CysG überproduziert wurde. Der Peak bei etwa 14 Minuten lässt deutlich erkennen, dass eine große Menge eines Stoffes gebildet wurde, der vermutlich das Substrat Sirohäm ist. Dies konnte über die Bestimmung der Masse bestätigt werden. In Abbildung 17B sind die extrahierten Tetrapyrrole der Katalyse des Stammes BL21+pETDuet1cysG+pACYCnirDLGH chromatographisch analysiert und aufgetragen. Dieser Stamm produzierte zusätzlich zu dem Sirohäm-produzierenden Protein CysG auch die Proteine NirDLGH. Das dazugehörige Chromatogramm 17B zeigte einen deutlichen Unterschied zu 17A. Bei ca. 14 Minuten lässt sich nur eine kleine Menge Sirohäm detektieren. Der folgende Peak bei etwa 15 Minuten könnte das Intermediat Monodecarboxy-Sirohäm sein, bei dem bereits eine Carboxylgruppe abgespalten wurde aber die zweite noch vorhanden ist. Dieses Intermediat konnte bereits von Bali *et al.* 2011 für die Umsetzung von Sirohäm durch NirDLGH aus *Pa. pantotrophus* nachgewiesen werden und konnte ebenfalls über die Masse identifiziert werden. Der dritte Peak bei 17,5 Minuten scheint das gebildete Produkt 12,18-Didecarboxy-Sirohäm zu sein, was ebenfalls durch die Bestimmung der Masse bestätigt wurde. Das Intermediat und das Produkt eluierten später von der

hydrophoben Säulenmatrix aufgrund einer bzw. zweier fehlender Carboxylgruppen, was zu einer höheren Hydrophobizität der Stoffe, im Vergleich zu Sirohäm, führte.

Damit konnte gezeigt werden, dass NirDLGH aus *P. aeruginosa* in der Lage ist, *in vivo* die Reaktion von Sirohäm zu 12,18-Didecarboxy-Sirohäm zu katalysieren ebenso wie das Homologon aus *Pa. pantotrophus* (Bali *et al.*, 2011).

Die bereits erwähnten Masse-Analysen des Substrats und der Produkte wurde in Kooperation mit Diplom-Chemiker Alexander Neumann vom Institut für organische Chemie der TU Braunschweig durchgeführt.

Die gemessenen Massenspektren nach der HPLC-Trennung sind in Abbildung 18 dargestellt. Die theoretisch zu erwartende Masse $[M+H]^+$ von Sirohäm war 917,21 m/z , die sich aus der Masse von Sirohäm mit 916,21 und einem zusätzlichen Wasserstoffproton zusammensetzt. Da im positiven Ionenmodus gemessen wurde, muss zu der Masse des Moleküls noch die Masse eines Wasserstoffprotons hinzugerechnet werden $[M+H]^+$. Gemessen wurde allerdings ein Wert von 912,24 m/z . Dieser Unterschied resultierte aus der Sauerstoff-abhängigen Bildung von Lactonringen am A- und B-Ring des Tetrapyrrols. Diese werden durch die Acetatgruppen am C2- und C7-Atom ausgebildet und wurden bereits von Battersby *et al.* (1977a) und Battersby *et al.* (1977b) beschrieben.

Die gemessene Masse von 912,24 m/z entspricht allerdings genau der theoretischen Masse des Sirohäm-Dilactons. Die erwartete Masse lag aufgrund des positiven Ionenmodus jedoch bei 913,24 m/z . Damit bleibt weiterhin eine Differenz von 1 m/z . Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass ein Wasserstoffproton aufgrund der Koordination des Zentralatoms, durch eine der Propionatseitenketten am C- oder D-Ring fehlt. Daraus ergibt sich dann die genaue Masse von 912,24 m/z für das Sirohäm-Dilacton. Um die genaue Struktur des vorliegenden Substrats zu bestimmen, müsste diese mittels NMR-Spektroskopie untersucht werden. Da für diese Untersuchungen große Mengen des Stoffes benötigt werden und die Menge des isolierten Stoffes gering ausfiel, war die Durchführung nicht möglich.

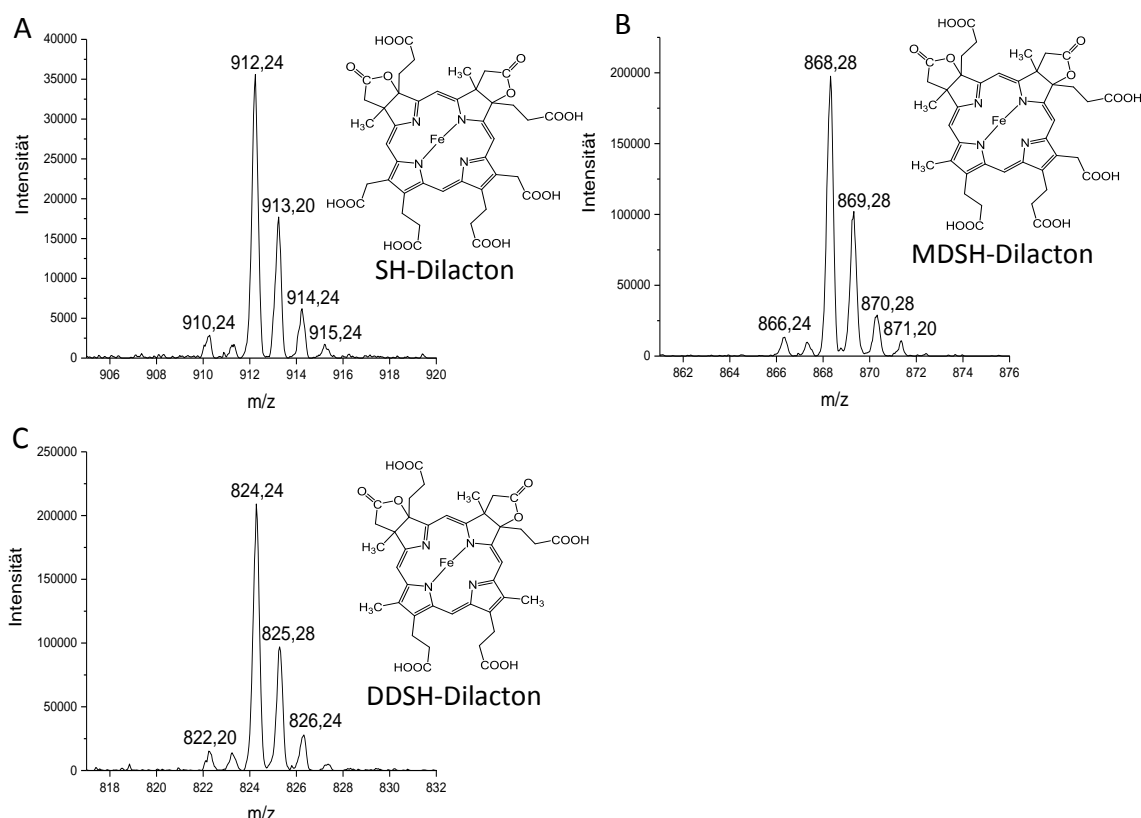


Abbildung 18: Isotopisches Massenspektrum nach HPLC-Trennung.

Aufgetragen ist die relative Intensität gegen m/z . A: Gezeigt ist die detektierte Masse plus ihrer Isotope vom Sirohäm-Dilacton sowie die Struktur. B: Gezeigt ist die detektierte Masse plus ihrer Isotope vom Monodecarboxy-Sirohäm-Dilacton sowie die Struktur. C: Gezeigt ist die detektierte Masse plus ihrer Isotope vom 12,18-Didecarboxy-Sirohäm-Dilacton sowie dessen Struktur. Gemessen wurde im positiven Ionen Modus.

Die weiteren detektierten Massen, die in Abbildung 18B und 18C dargestellt sind, wurden aus dem Versuchsansatz mit den Proteinen CysG und NirDLGH bestimmt. In diesem Ansatz konnte die Masse für das Produkt der Reaktion 12,18-Didecarboxy-Sirohäm in der Dilacton-Form mit $824,24 \text{ } m/z$ sowie das Intermediat Monodecarboxy-Sirohäm-Dilacton mit $868,28 \text{ } m/z$ bestimmt werden. Allerdings zeigen sich auch hier dieselben Abweichungen von der theoretisch erwarteten Masse zu der gemessenen Masse. Auch hier liegen die Substanzen als Dilacton-Form und mit einem fehlenden Wasserstoffproton vor.

Damit konnte über die Massenspektrometrie gezeigt werden, dass die Stoffe im Chromatogramm der Abbildung 16 mit den Retentionszeiten 14 Minuten Sirohäm, 15 Minuten Monodecarboxy-Sirohäm und 17,5 Minuten 12,18-Didecarboxy-Sirohäm in den jeweiligen Dilacton-Formen waren. Die Hypothese, dass es sich bei NirDLGH aus *P. aeruginosa* ebenfalls um eine Sirohäm-Decarboxylase handelt, konnte somit bestätigt werden.

4.2.2 Heterologe Produktion und Reinigung von NirDLGH aus *P. aeruginosa*

Die Proteine NirDLGH wurden heterolog in *E. coli* BL21(DE3) unter aeroben Bedingungen produziert, wie in Kapitel 3.7.3 beschrieben. Die Homodimere NirDL und NirGH wurden mittels der Vektoren pACYC*nirDL* und pETDuet1*nirGH* produziert und im Anschluss mittels Nickelchelataffinitätschromatographie gereinigt (siehe Kapitel 3.7.8). Hierzu waren NirD und NirG mit einem N-terminalen His₆-Tag produziert worden. Durch die große Affinität von NirD zu NirL und NirG zu NirH konnten die Komplexe NirDL und NirGH gereinigt werden. Da die gereinigten Proteine für den *in vitro*-Enzymaktivitätstest eingesetzt und im Rahmen dessen mit zellfreiem *E. coli*-Extrakt vermischt wurden, folgte kein zusätzlicher Reinigungsschritt.

Die Abbildungen 19 und 20 zeigen die SDS-PAGE-Analysen der Produktionen und die einzelnen affinitätschromatographischen Reinigungsschritte für die Proteine NirDL (Abbildung 19) und NirGH (Abbildung 20).

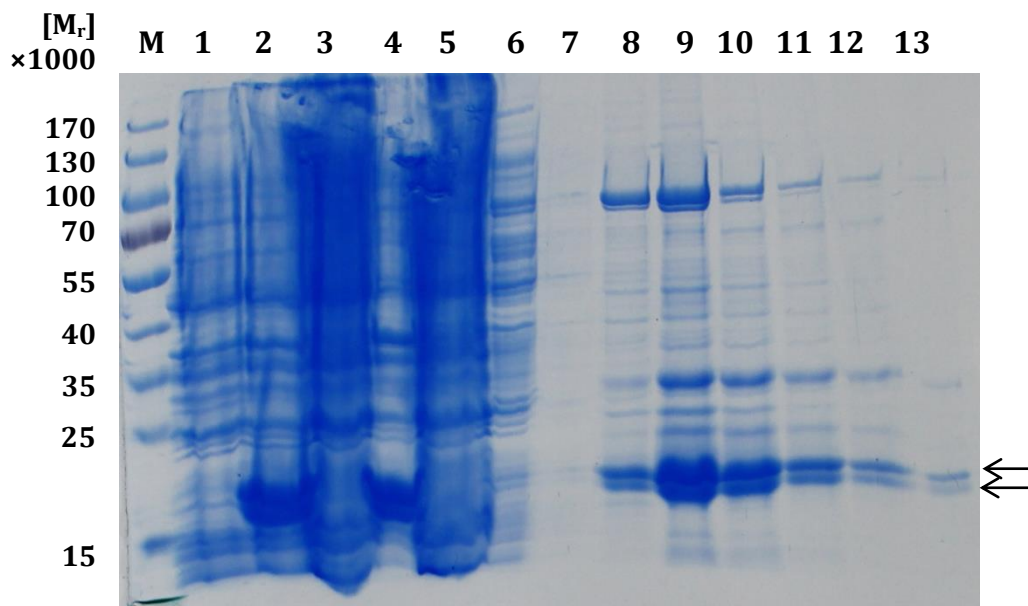


Abbildung 19: SDS-PAGE-Analyse der Produktion und Affinitätschromatographie von NirDL.

Gezeigt ist ein 12%iges SDS-Gel nach der Färbung mit Coomassie. Spur M: Proteingrößenstandard mit angegebenen relativen Molekülmassen $[M_r] \times 1000$. Spur 1: Gesamtproteingehalt der Zellen vor Induktion; Spur 2: Gesamtproteingehalt der Zellen nach Induktion; Spur 3: Proteine des Zellsediments nach Aufschluss und Zentrifugation; Spur 4: Lösliche Proteine nach Aufschluss und Zentrifugation; Spur 5: Proteine des Durchflusses der Affinitätschromatographie; Spur 6: Proteine der Waschfraktion 1; Spur 7: Proteine der Waschfraktion 2; Spuren 8-12: Proteine der Elutionsfraktionen 1-5; Spur 13: Probe des Säulenmaterials nach Elution. Die Pfeile markieren die beiden Zielproteine NirD und NirL.

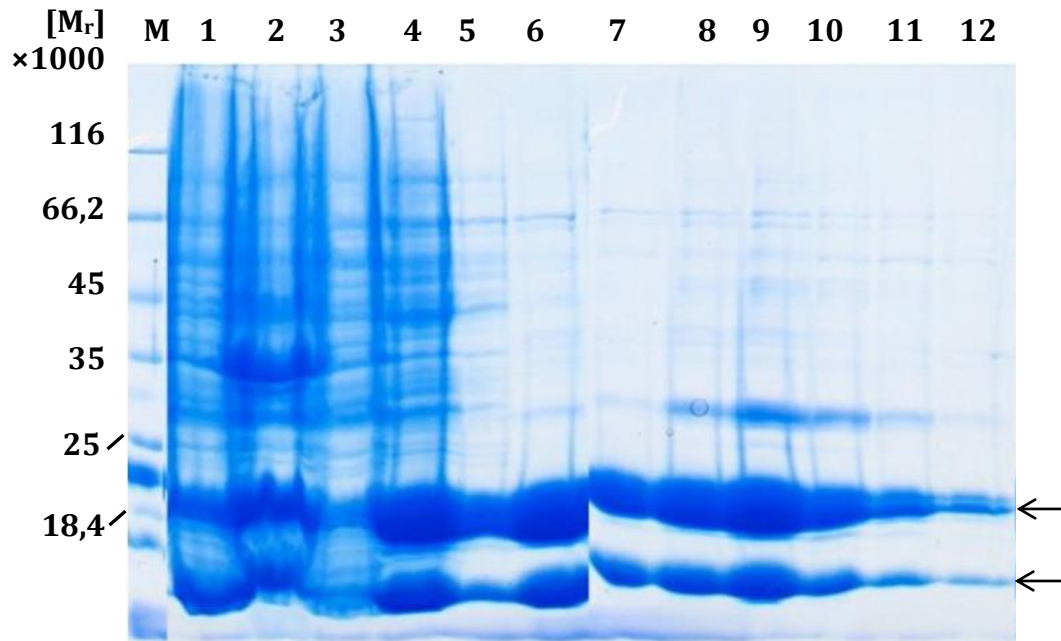


Abbildung 20: SDS-PAGE-Analyse der Produktion und Affinitätschromatographie von NirGH.

Gezeigt ist ein 12%iges SDS-Gel nach der Färbung mit Coomassie. Spur M: Proteingrößenstandard mit angegebenen relativen Molekülmassen $[M_r] \times 1000$. Spur 1: Proteine des Zellsediment nach Aufschluss und Zentrifugation; Spur 2: Lösliche Proteine nach Aufschluss und Zentrifugation; Spur 3: Proteine des Durchflusses der Affinitätschromatographie; Spur 4: Proteine der Waschfraktion 1; Spur 5: Proteine der Waschfraktion 2; Spur 6: Proteine der Waschfraktion 3; Spuren 7-11: Proteine der Elutionsfraktionen 1-5; Spur 12: Probe des Säulenmaterials nach Elution. Die beiden Pfeile markieren die Zielproteine NirG und NirH.

Die SDS-PAGE-Analyse für die Reinigung von rekombinantem NirDL (Abbildung 19) zeigte, dass NirDL in großen Mengen produziert wurde (Spur 2) und als lösliches Protein vorlag (Spur 4). Dementsprechend wurde das Protein mittels eines N-terminalen His-Tags gereinigt (Spur 8-12). Die Proteine besitzen ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 17,0 kDa für NirD und 20,2 kDa für NirL. Zusätzlich zu den beiden Proteinen waren noch weitere Proteinbanden im Bereich von 130 bis 25 kDa als Verunreinigungen zu erkennen. Da die gereinigten Proteine für den *in vitro*-Enzymaktivitätstest eingesetzt und im Rahmen dieses Tests mit zellfreiem CysG-*E. coli*-Extrakt vermischt wurden, stellten die Verunreinigungen keine weiteren Probleme dar.

Die Produktion und Reinigung von NirGH verlief ebenfalls erfolgreich (Abbildung 20). Das vorhergesagte Molekulargewicht der Proteine NirG und NirH beträgt 16,6 kDa und 19,6 kDa, was den Proteinbanden der Elutionsfraktionen in Abbildung 19, Spur 7-11 entspricht. Die Konzentration nach der Reinigung lag bei NirDL zwischen 1,48 und 2,66 mg/mL während sich die von NirGH zwischen 4,22 und 6,11 mg/mL befand.

Im Anschluss wurden die Proteine anaerob in den Enzymtestpuffer überführt (siehe 3.7.13) und wenn nötig konzentriert (siehe 3.7.12), bevor sie für den *in vitro*-Enzymtest eingesetzt wurden.

4.2.3 *In vitro*-Enzymaktivität von NirDLGH aus *P. aeruginosa*

Um die Umsetzung von Sirohäm zu 12,18-Didecarboxy-Sirohäm nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ bestimmen zu können, wurde ein *in vitro*-Enzymaktivitätstest unter anaeroben Bedingungen etabliert. Dieser wurde wie in Kapitel 3.7.19 beschrieben mit zellfreiem CysG-*E.coli*-Extrakt und den gereinigten Proteinen NirDLGH, durchgeführt. Die Ansätze wurden für 6 h bei 37 °C anaerob inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Tetrapyrrolextraktion (siehe 3.7.15) und die Analyse der Tetrapyrrole mittels HPLC (siehe 3.7.16).

Die Abbildung 21 zeigt die chromatographische Auswertung des Aktivitätstests.

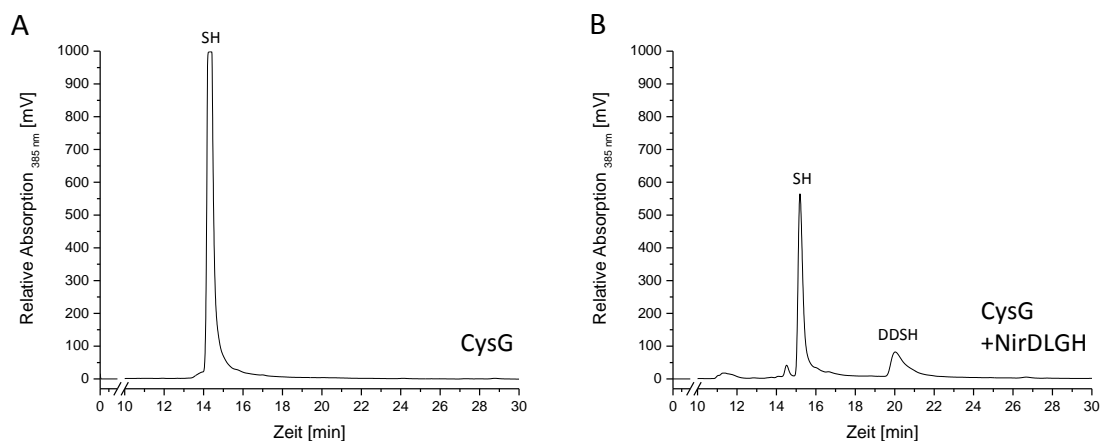


Abbildung 21: HPLC-Chromatogramme der Tetrapyrrole nach *in vitro*-Enzymaktivität von NirDLGH aus *P. aeruginosa*.

Dargestellt ist die relative Absorption bei 385 nm in Millivolt gegen die Retentionszeit in Minuten. Die Retentionszeit zwischen 1 und 10 Minuten sowie von 30 bis 51 Minuten ist nicht abgebildet. (A) Chromatogramm der Tetrapyrrole aus aufgeschlossenen Sirohäm-produzierenden Zellen (CysG) im Testpuffer ohne Zugabe von Protein. (B) Analyse der Probe aus aufgeschlossenen Sirohäm-produzierenden Zellen (CysG) und den Proteinen NirDLGH aus *P. aeruginosa*.

Das Chromatogramm der Negativkontrolle, in der die aufgeschlossenen Sirohäm-produzierenden Zellen (CysG-*E. coli*-Extrakt) im Testpuffer inkubiert wurden (siehe Abbildung 21A), zeigte bei etwa 14,5 Minuten einen deutlichen Sirohäm-Ausschlag (SH). Weitere Tetrapyrrole waren nicht zu erkennen. Der Testansatz, in dem zusätzlich die Proteine NirDLGH enthalten waren (siehe Abbildung 21B), ließ zusätzlich zu dem Substrat Sirohäm noch ein weiteres gebildetes Tetrapyrrol erkennen. Bei einer

Retentionszeit von etwa 20 Minuten eluierte das Produkt 12,18-Didecarboxy-Sirohäm (DDSH). Die leichten Verschiebungen in der Retentionszeit von SH und DDSH im Vergleich zu früheren Experimenten, sind vermutlich auf die zwischenzeitliche Benutzung der HPLC-Säule und die dadurch entstandene stärkere Verunreinigung der Säule zurückzuführen. Um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um SH und DDSH bei den eluierten Stoffen handelte, wurden die Proben ebenfalls mittels HPLC-MS untersucht (Daten nicht gezeigt), was die Identität von SH bzw. DDSH bestätigte. Es konnte also gezeigt werden, dass die gereinigten Proteine NirDLGH aus *P. aeruginosa* auch *in vitro* in der Lage sind das Substrat Sirohäm zu 12,18-Didecarboxy-Sirohäm umzusetzen.

Die Proteine NirD und NirG besitzen eine sehr hohe Affinität zu NirL bzw. NirH, was die Koreinigung der heterodimeren Komplexe ermöglicht. Zusätzlich konnte Johannes Walther 2011 bereits zeigen, dass die Affinität aller vier Proteine zueinander nicht ausreicht um diese als Tetramer zu reinigen. Es ist denkbar, dass NirDL und NirGH auch in der Zelle als Dimere vorliegen. Ebenso ist bekannt, dass manche Organismen wie z.B. *Hydrogenobacter thermophilus* und *Persephonella marina* keine *nirG*- und *nirH*-Gene besitzen (Zeytun *et al.*, 2011; Reysenbach *et al.*, 2009). Außerdem konnte Bali *et al.* 2011 zeigen, dass NirDLGH aus *Pa. pantotrophus* Sirohäm zu 12,18-Didecarboxy-Sirohäm umsetzt und der Einsatz von NirDL zu dem Intermediat Monodecarboxy-Sirohäm führt. Damit konnte für *Pa. pantotrophus* eine Teilreaktion von Sirohäm zu 12,18-Didecarboxy-Sirohäm nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen ob NirDL oder NirGH aufgrund dieser Ergebnisse als Dimer in der Lage sind DDSH aus SH zu generieren wurden weitere *in vitro*-Enzymaktivitätstest von Sarah Ressel durchgeführt (Sarah Ressel, 2013). Hierzu wurde der zellfreie CysG-Extrakt mit den Dimeren NirDL und NirGH einzeln für 6 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurde zur Kontrolle ein Ansatz mit allen Proteinen gewählt und ein Weiterer, bei dem zuerst NirDL für 3 Stunden inkubiert und im Anschluss NirGH für weitere 3 Stunden hinzugegeben wurde.

In Abbildung 22A ist das Ergebnis des anaeroben *in vitro*-Enzymaktivitätstest der Proteine NirDL aus *P. aeruginosa* mit dem Sirohäm-enthaltenden zellfreien Extrakt nach 6 Stunden Inkubation, Tetrapyrrolextraktion und anschließender HPLC-Analyse dargestellt. Es waren zwei deutliche Peaks im Chromatogramm zu erkennen. Der eine konnte dem Substrat Sirohäm, bei einer Retentionszeit von circa 15 Minuten und der zweite dem Intermediat Monodecarboxy-Sirohäm, bei 17 Minuten, durch HPLC-MS

zugeordnet werden. Damit wurde gezeigt, dass NirDL aus *P. aeruginosa* Sirohäm umsetzt. Allerdings war es nicht in der Lage 12,18-Didecarboxy-Sirohäm zu produzieren, sondern nur das Intermediat der Reaktion Monodecarboxy-Sirohäm.

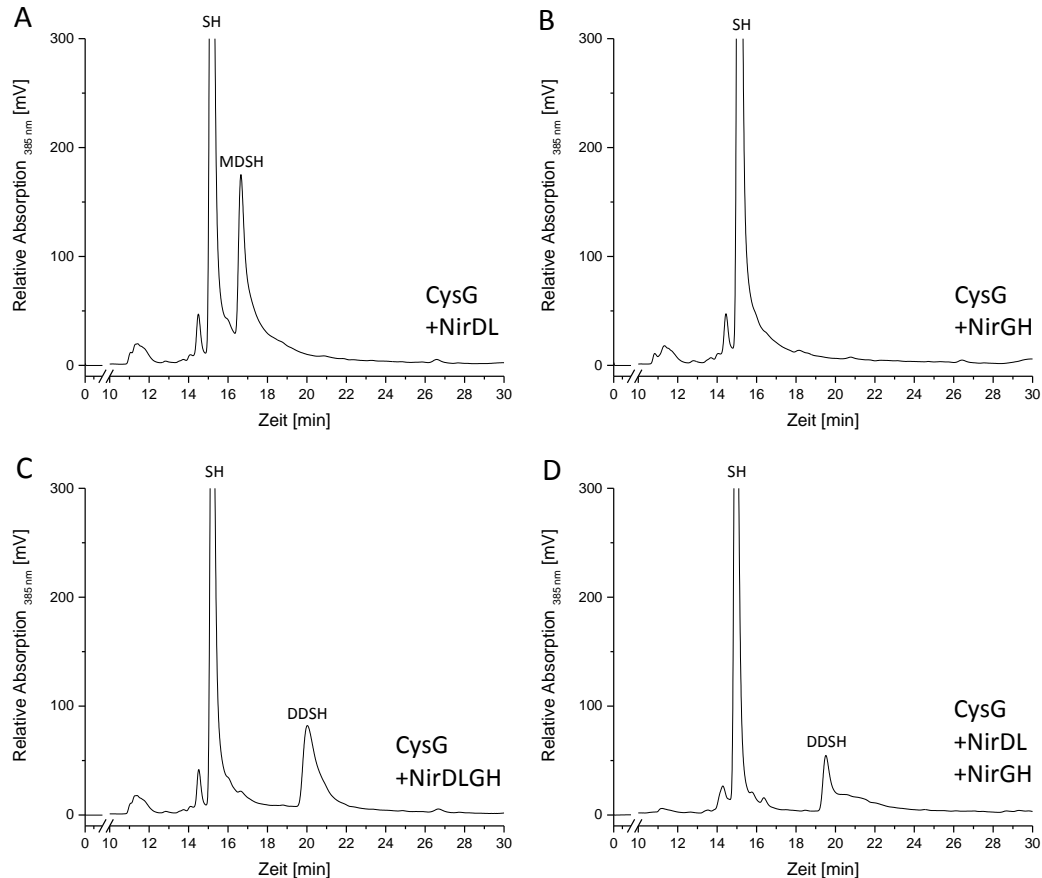


Abbildung 22: Chromatographische Analyse der Tetrapyrrole aus den verschiedenen *in vitro*-Enzymaktivitätstests mit zellfreiem CysG-Extrakt und den Proteinen NirDL (A), NirGH (B), NirDLGH (C) und NirDL + NirGH (D) aus *P. aeruginosa*.

Aufgetragen ist die relative Absorption bei 385 nm in Millivolt gegen die Retentionszeit in Minuten. Die Retentionszeiten zwischen 1 und 10 sowie 30 bis 51 Minuten sind nicht dargestellt. Die eluierten Stoffe Sirohäm (SH), Monodecarboxy-Sirohäm (MDSH) und 12,18-Didecarboxy-Sirohäm (DDSH) sind gekennzeichnet. (A) Chromatographische Analyse des *in vitro*-Enzymaktivitätstests nach 6 Stunden Inkubation von Sirohäm mit gereinigtem NirDL. (B) Der Enzymtest enthielt Sirohäm und gereinigtes NirGH. Während (C) Sirohäm und mit gereinigtem NirDLGH inkubiert wurde. (D) In diesem Ansatz wurde Sirohäm die ersten 3 Stunden mit NirDL inkubiert und im Anschluss ist NirGH für weitere 3 Stunden hinzugegeben worden (Sarah Ressel, 2013).

Im Testansatz mit dem gereinigten Protein NirGH wurde auch nach 6-stündiger Inkubation kein weiteres gebildetes Tetrapyrrol außer SH detektiert (siehe Abbildung 22B). NirGH aus *P. aeruginosa* war damit nicht in der Lage *in vitro* Sirohäm als Substrat zu nutzen und umzusetzen, da weder das Produkt DDSH noch das Intermediat MDSH detektiert wurde.

Der Versuchsansatz mit den gereinigten Proteinen NirDLGH, der in Abbildung 22C dargestellt ist, zeigte wie in vorhergegangenen Untersuchungen (siehe Kapitel 4.2.3), dass alle vier Proteine gemeinsam DDSH synthetisieren.

Das Chromatogramm 22D zeigt das Ergebnis eines Tests, in dem der zellfreie Sirohäm-Extrakt anaerob innerhalb der ersten 3 Stunden mit den Proteinen NirDL inkubiert wurde und im Anschluss die Proteine NirGH hinzugefügt wurden. Nach weiteren 3 Stunden Inkubation wurden die Tetrapyrrole extrahiert und analysiert. Für diesen Test wurde bei 19,5 Minuten das Produkt der Reaktion DDSH detektiert. Somit lieferte dieser Versuchsansatz dasselbe Ergebnis wie das von NirDLGH (siehe Abbildung 22C). Dabei wurde in den ersten drei Stunden von NirDL MDSH aus SH gebildet und das später hinzugefügte NirGH setzte MDSH zu DDSH um.

Die einzelnen Versuchsansätze haben gezeigt, dass NirDL Sirohäm als Substrat nutzen kann und zu dem Intermediat MDSH umsetzt. NirGH kann Sirohäm nicht umsetzen und ist auf das Intermediat der Reaktion MDSH als Substrat angewiesen woraus es dann wiederum DDSH synthetisiert.

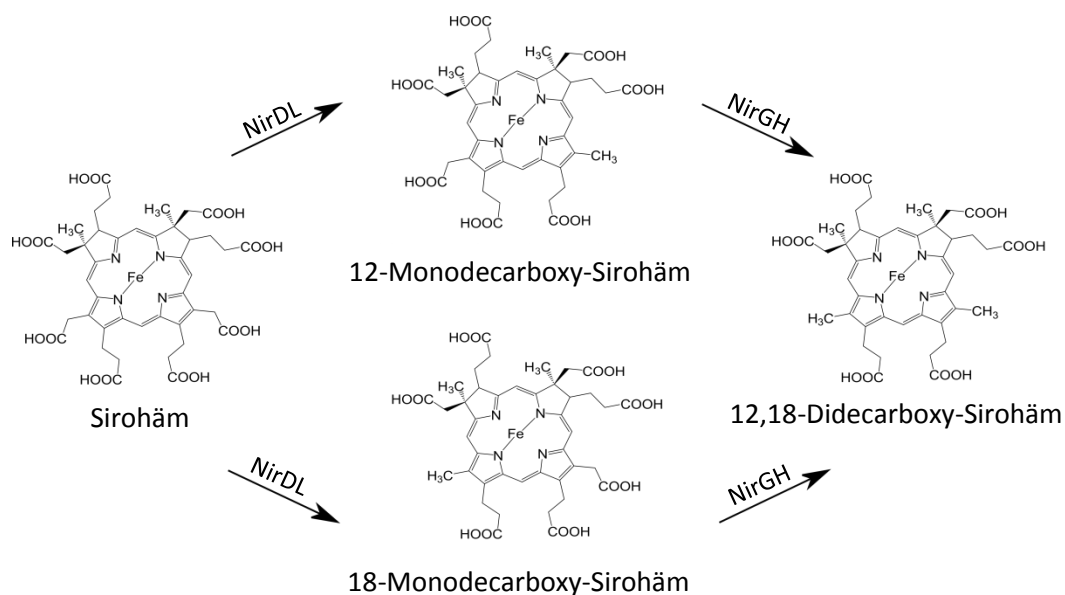


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Decarboxylierung von Sirohäm durch NirDLGH aus *P. aeruginosa*.

Die Decarboxylierung von Sirohäm zu 12,18-Didecarboxy-Sirohäm durch NirDLGH aus *P. aeruginosa* verläuft schrittweise über die Intermediate 12- oder 18-Monodecarboxy-Sirohäm.

Daraus leitet sich die Reihenfolge der Reaktion zur Umsetzung von Sirohäm zu DDSH ab. NirDL bindet als Dimer Sirohäm und spaltet eine Carboxylgruppe der Acetatgruppe an der C12- oder C18-Position ab. Anschließend wird vermutlich das gebildete MDSH an NirGH übergeben, wo dann die zweite Decarboxylierung stattfindet und DDSH

synthetisiert wird. Die Abbildung 23 zeigt die Reaktion von SH zu DDSH, die durch die Proteine NirDLGH katalysiert wird, wobei noch nicht bekannt ist, welche der beiden Acetatgruppen zuerst decarboxyliert wird.

4.2.4 *In vitro*-Enzymaktivität von NirDLGH aus *P. aeruginosa* in Anwesenheit von DNA-Fragmenten

Die Proteine NirDLGH aus *P. aeruginosa* sind als Transkriptionsregulatoren annotiert (Winsor *et al.*, 2015). Zusätzlich zeigen die Ergebnisse die in Kapitel 4.1 dargestellt sind, dass die Proteine einen Einfluss auf die Transkription der nachfolgenden *nirJEN*-Gene haben. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Anwesenheit der *nirJ*-Promotor-DNA einen Einfluss auf *in vitro*-Enzymaktivität der Proteine NirDLGH hat.

Dazu wurde dem *in vitro*-Enzymaktivitätstest, der wie in Kapitel 3.7.19 beschrieben durchgeführt wurde, 500 nM DNA zugesetzt. Die DNA entsprach der putativen NirDLGH-Binderegion welche *upstream* des *nirJ*-Gens von -64 bp bis -24 bp liegt.

Nach 6-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Tetrapyrrole extrahiert und die Proben mittels HPLC analysiert.

In Abbildung 24 sind die HPLC-Chromatogramme der einzelnen Ansätze dargestellt. Die Chromatogramme 24A und 24B zeigen die Ergebnisse für die Ansätze von NirDLGH mit und ohne Zugabe von DNA. Dabei war das Substrat SH sowie das Reaktionsprodukt DDSH zu erkennen. Es waren keine deutlichen Unterschiede zwischen den Ansätzen mit und ohne DNA zu erkennen, lediglich die Menge des gebildeten DDSH war im Ansatz mit DNA etwas geringer. Die Teile C und D der Abbildung zeigen die Chromatogramme der Enzymtests von NirDL ebenfalls mit und ohne DNA. Hier wurden das Substrat SH sowie das Intermediat MDSH und das Produkt DDSH detektiert. Im Vergleich zu vorherigen Untersuchungen wurde nicht nur MDSH sondern auch eine kleine Menge DDSH detektiert. Dies lässt sich vermutlich auf die unterschiedlichen Mengen des eingesetzten Substrats zurückführen. Es ließ sich nur in wenigen Untersuchungen nachweisen. Einen Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne DNA war nicht zu erkennen. Die Ergebnisse des *in vitro*-Enzymaktivitätstest von NirGH mit und ohne DNA sind in Abbildung 24E und 24F dargestellt. Dabei wurde nur das Substrat SH detektiert, es wurden keine weiteren Tetrapyrrole gebildet. Ebenso wie bei den Ansätzen mit NirDL war auch hier kein Unterschied zwischen den Ansätzen zu erkennen.

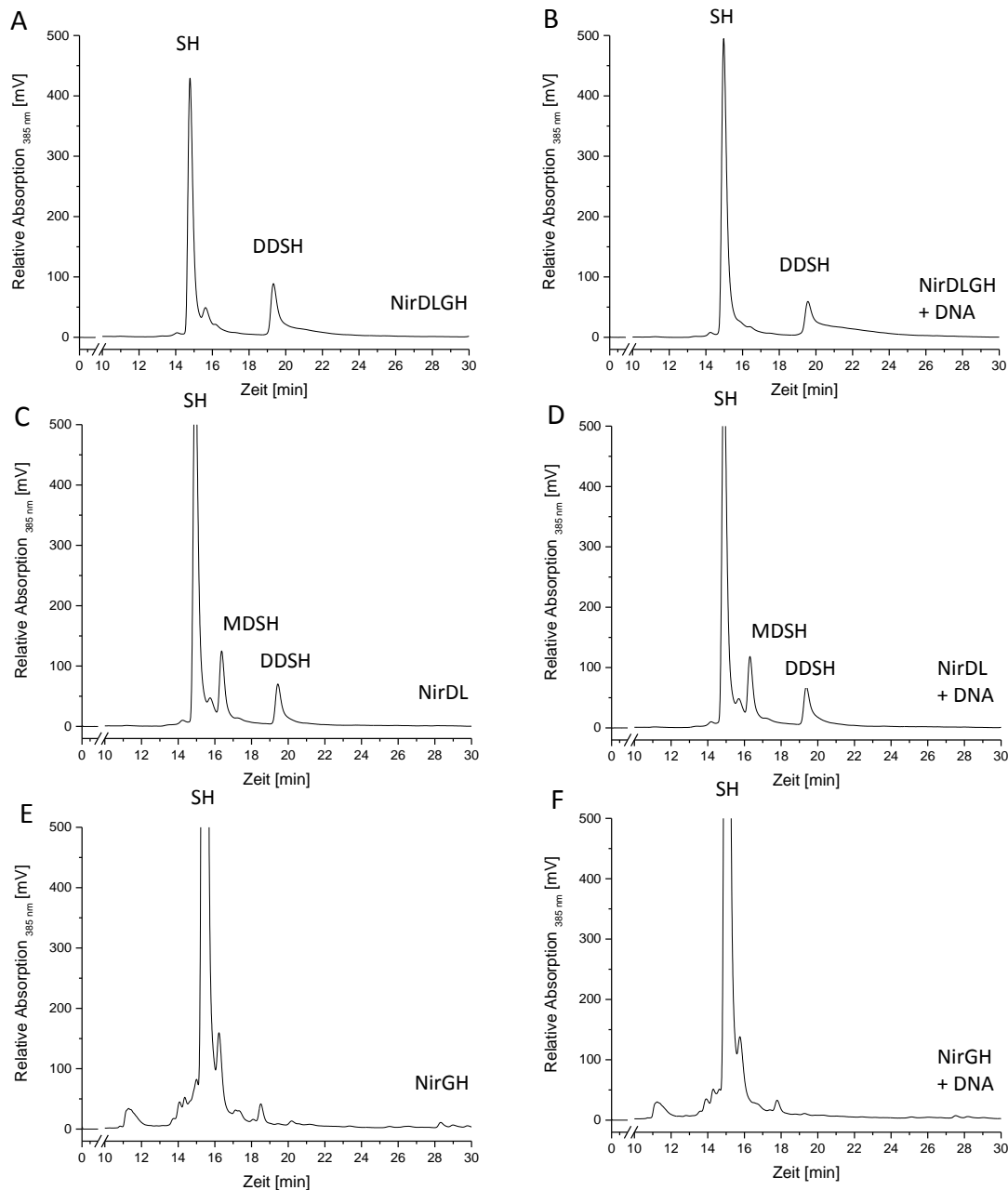


Abbildung 24: Chromatographische Analyse der *in vitro*-Enzymtests von NirDLGH mit DNA-Fragment.

Dargestellt ist die relative Absorption bei 385 nm in Millivolt gegen die Retentionszeit in Minuten. Die Zeiten zwischen 1 und 10 Minuten sowie von 30 bis 51 Minuten sind nicht abgebildet. Untersucht wurde die Umsetzung von Sirohäm (SH) zu 12,18-Didecarboxy-Sirohäm (DDSH) über das Intermediat Monodecarboxy-Sirohäm (MDSH) durch die Proteine NirDLGH (A) sowie zusätzlich mit DNA (B), NirDL (C) sowie zusätzlich mit DNA (D) und NirGH (E) sowie zusätzlich DNA (F) aus *P. aeruginosa*. Die DNA hatte eine Konzentration von 500 nM und umfasste die Region von -64 bp bis -24 bp *upstream* des *nirJ*-Gens.

Zwischen den Versuchsansätzen mit und ohne DNA war im Falle der Dimere NirDL und NirGH kein Unterschied in den Chromatogrammen zu erkennen. Im Falle des von NirDLGH war zu erkennen, dass die Menge an gebildetem DDSH etwas geringer war als im Versuchsansatz ohne DNA. Es wäre aber in weiteren Experimenten zu klären, ob

dieser Unterschied reproduzierbar und signifikant ist, da dieses Experiment nur zweimal durchgeführt wurde.

Es wäre denkbar, dass eine Anlagerung von NirDLGH an die DNA die Blockierung des Zugangs zum aktiven Zentrum oder eine Konformationsänderung der Proteine zur Folge haben könnte. Dadurch könnte die Umsetzung von SH in Anwesenheit der DNA möglicherweise behindert werden. Im Falle der einzelnen Heterodimere NirDL und NirGH hingegen scheint keine Beeinträchtigung der Enzymaktivität aus der Anwesenheit der DNA zu resultieren.

Um eine Aussage über die Lage des aktiven Zentrums und die möglichen Konformationsänderungen durch Bindung des Substrats oder der DNA treffen zu können sollte im Folgenden die Struktur der Proteine röntgenkristallographisch untersucht werden.

Aufgrund dessen, dass sich erste kristallographische Untersuchungen von NirDLGH aus *P. aeruginosa* durch Johannes Walther als nicht erfolgreich herausstellten, wurde für die weiteren Kristallisationsversuche das homologe Fusionsprotein NirDL aus *Hydrogenobacter thermophilus* eingesetzt.

4.3 Die Sirohäm-Decarboxylase NirDL aus *Hydrogenobacter thermophilus*

Das Fusionsprotein NirDL aus dem chemolithoautotrophen Denitrifizierer *Hydrogenobacter thermophilus* (*H. thermophilus*) stellt ein Homologon zu NirDL bzw. NirGH aus *P. aeruginosa* dar. Im Gegensatz zu *P. aeruginosa* oder *Pa. Pantotrophus* produziert *H. thermophilus* kein NirG und NirH, sodass es sich bei dem Fusionsprotein NirDL um die einzige Sirohäm-Decarboxylase in *H. thermophilus* handeln könnte. (Arai *et al.*, 2010)

Da NirDL aus *H. thermophilus* für die kristallographischen Untersuchungen eingesetzt wurde, sollte im Folgenden ermittelt werden, ob das Protein ebenfalls in der Lage ist die Reaktion von Sirohäm zu 12,18-Didecarboxy-Sirohäm zu katalysieren. Außerdem sollte das Fusionsprotein weiter charakterisiert werden.

4.3.1. Heterologe Produktion und Reinigung von NirDL aus *H. thermophilus*

Um das Fusionsprotein NirDL genauer charakterisieren zu können, wurde der Vektor pET22bnirDL(*H.th.*) in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) eingebracht. Daraufhin wurde das Protein NirDL wie in Kapitel 3.7.4 beschrieben produziert und gereinigt (siehe

Kapitel 3.7.6-3.7.8). Im Anschluss an die Nickelchelat-Affinitätschromatographie erfolgte kein weiterer Reinigungsschritt. Die Abbildung 25 zeigt die SDS-PAGE-Analyse der einzelnen Produktions- und Reinigungsschritte.

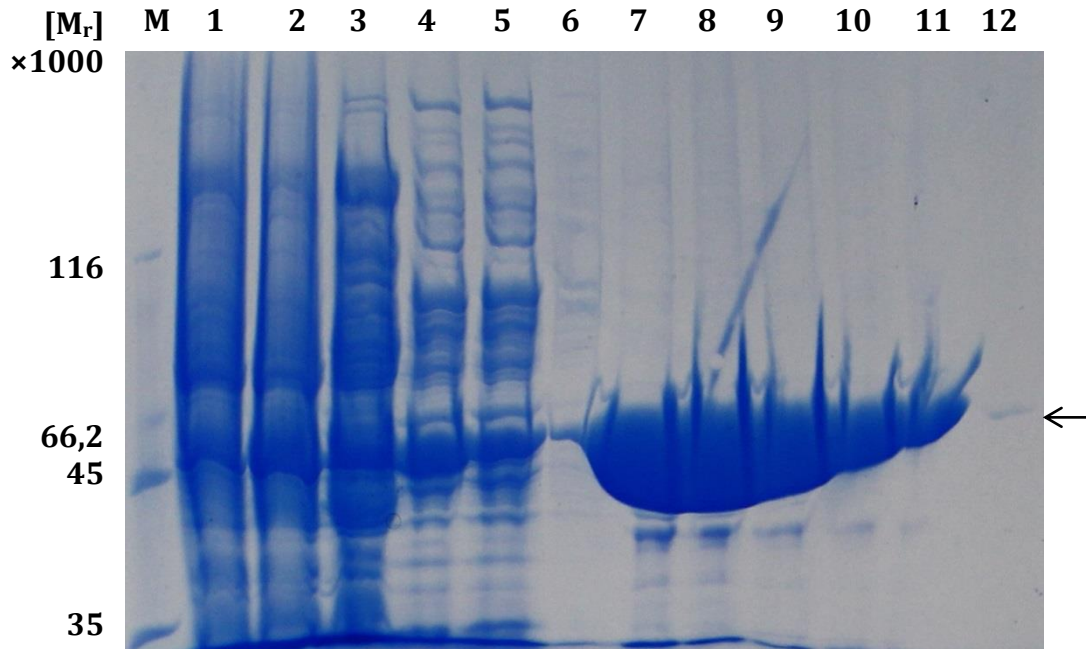


Abbildung 25: SDS-PAGE-Analyse der Produktion und Affinitätschromatographie von NirDL aus *H. thermophilus*.

Gezeigt ist ein 12%iges SDS-Gel nach der Färbung mit Coomassie. Die Produktion erfolgte in *E. coli* BL21(DE3). Spur M: Proteingrößenstandard mit angegebenen relativen Molekülmassen [M_r] × 1000. Spur 1: Zellen nach Induktion; Spur 2: Zellsediment nach Aufschluss und Zentrifugation; Spur 3: Lösliche Proteine nach Zellaufschluss und Zentrifugation; Spur 4: Proteine des Durchflusses der Affinitätschromatographie; Spur 5: Proteine der Waschfraktion 1; Spur 6: Proteine der Waschfraktion 2; Spuren 7-11: Proteine der Elutionsfraktionen 1-5; Spur 12: Probe des Säulenmaterials nach Elution. Der Pfeil markiert das Zielprotein NirDL.

Die SDS-PAGE-Analyse für die Reinigung des Proteins NirDL aus *H. thermophilus* zeigt, dass NirDL in sehr großen Mengen produziert wurde (Spur 1) und als lösliches Protein vorlag (Spur 3). Das Protein konnte ohne Probleme mit N-terminalem His-tag gereinigt werden (Spuren 7-11).

Die Verunreinigungen durch weitere Proteine in den Elutionsfraktionen waren relativ gering, was vermutlich auf den Hitzeschock, nach dem Aufschluss und der Sedimentation der Zelltrümmer, zurückzuführen ist. Hierbei wurde die Proteinlösung aufgrund der Thermostabilität von NirDL auf 65 °C erhitzt, sodass ein Großteil der *E. coli*-eigenen Proteine denaturierte. Die Spur 12 enthielt die Probe des Säulenmaterials nach der Reinigung. Sie zeigte nur einen geringen Rückstand des Zielproteins NirDL aus *H. thermophilus*. Das gereinigte Protein lag in einer Konzentration zwischen 1 mg/mL und 9,3 mg/mL vor.

Im Anschluss wurde das gereinigte Protein in anaeroben Enzymtestpuffer überführt (siehe 3.7.13) und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in Anaerobenflaschen gelagert.

4.3.2 *In vitro*-Enzymaktivität von NirDL aus *H. thermophilus*

Das Fusionsprotein NirDL aus dem Organismus *H. thermophilus* ist ein Homologon der Proteine NirDLGH aus *P. aeruginosa*. Da dieses Protein bisher nicht weitergehend charakterisiert wurde, sollte überprüft werden, ob es sich ebenfalls um eine Sirohäm-Decarboxylase handelt.

Um diese Hypothese zu untersuchen wurde ein *in vitro*-Enzymaktivitätstest etabliert, ähnlich dem Test von NirDLGH aus *P. aeruginosa* (siehe Kapitel 3.7.19). Lediglich die Inkubationstemperatur und -zeit wurde verändert. Dazu wurde gereinigtes NirDL zusammen mit dem zellfreien CysG-*E. coli*-Extrakt im Testpuffer für 2 Stunden bei 60 °C oder bei 40 °C über Nacht inkubiert. Aufgrund der Vergleichbarkeit der Ergebnisse sind im Folgenden nur Ansätze nach 2 Stunden bei 60 °C Inkubation gezeigt. Die Abbildung 26 zeigt das HPLC-Chromatogramm des *in vitro*-Enzymaktivitätstests von NirDL aus *H. thermophilus*.

In Abb. 26A ist die Analyse der Negativkontrolle nach zweistündiger Inkubation bei 60 °C dargestellt, die kein gereinigtes NirDL-Protein enthielt. Es war zu erkennen, dass Sirohäm ähnlich wie in vorherigen Untersuchungen bei 14,5 Minuten von der Säule eluierte. Bei den zusätzlichen Peaks rund um Sirohäm handelt es sich in den meisten Fällen um dreifach methyliertes Uroporphyrinogen III. Dieses entsteht, wenn anstatt bei Precorrin-2 zwei Methylgruppen eine dritte an das Tetrapyrrol angefügt wird. Dieses Produkt stellt ein Endprodukt dar, was nicht weiter der Biosynthese von Häm d_1 zur Verfügung steht.

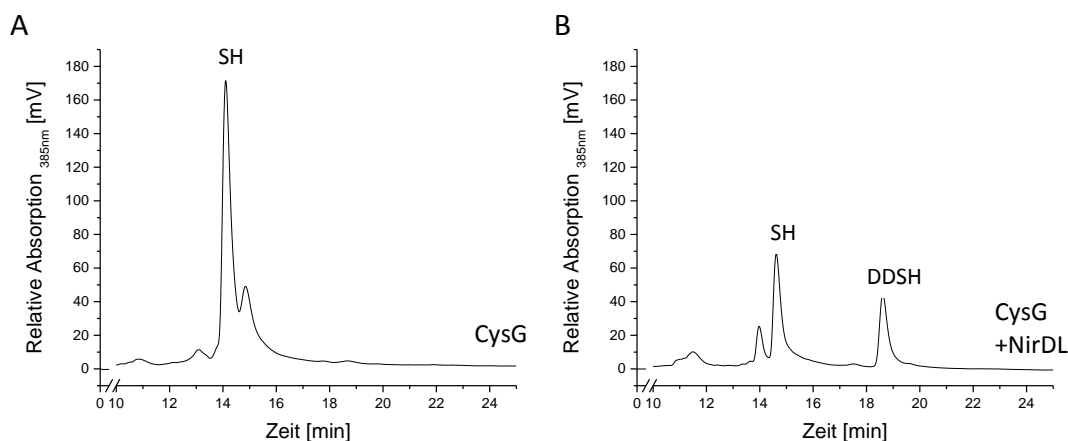


Abbildung 26: Chromatographische Analyse der *in vitro*-Enzymaktivität mit zellfreiem CysG-Extrakt und dem Protein NirDL aus *H. thermophilus*.

Aufgetragen ist die relative Absorption bei 385 nm in Millivolt gegen die Retentionszeit in Minuten. Die Retentionszeiten zwischen 1 und 10 sowie 25 bis 51 Minuten sind nicht dargestellt. Die Eluenten Sirohäm (SH) und 12,18-Didecarboxy-Sirohäm (DDSH) sind gekennzeichnet. (A) Chromatographische Analyse des *in vitro*-Enzymaktivitätstests nach 2 Stunden und 60 °C Inkubation vom zellfreien CysG-Extrakt. (B) Der Enzymtest enthielt Sirohäm und gereinigtes NirDL nach 2 h und 60 °C Inkubation.

Zusätzlich dazu wurde in manchen Untersuchungen durch LC-MS die Masse von Sirohäm für zwei verschiedene Peaks detektiert. Diese Beobachtung ist nur bei der LC-MS-Messung am Institut für Organische Chemie aufgetreten und ist vermutlich auf die dortige LC-MS-Anlage zurückzuführen. Dies wurde allerdings nicht weiter untersucht.

In Abbildungsteil 26B ist die Analyse des Enzymtests in Anwesenheit von gereinigtem NirDL aus *H. thermophilus* dargestellt. Zusätzlich zu dem eluierten Sirohäm bei circa 14,5 Minuten, eluierte ein weiteres Tetrapyrrol nach circa 18,5 Minuten. Durch die Erfahrung aus den Enzymtests mit NirDLGH aus *P. aeruginosa* und der weiteren Untersuchung des eluierten Stoffes mittels LC-MS, konnte der zweite Stoff als 12,18-Didecarboxy-Sirohäm bestimmt werden.

Es konnte damit gezeigt werden, dass es sich bei dem Fusionsprotein NirDL aus *H. thermophilus* ebenso um eine Sirohäm-Decarboxylase handelt wie NirDLGH aus *P. aeruginosa*. Da der Stamm *H. thermophilus* nur das Gen für NirDL und keine weiteren für NirG und NirH besitzt, handelt es sich hierbei um die einzige Sirohäm-Decarboxylase in diesem Organismus. Es gibt eine Reihe weiterer Organismen, die kein NirG und NirH bilden wie z.B. *Hydrogenobaculum* sp. Y04AAS1 und *Persephonella marina* (Reysenbach *et al.*, 2009). Auch bei diesen Organismen ist anzunehmen, dass das Fusionsprotein NirDL als alleinige Sirohäm-Decarboxylase agiert.

4.3.3 Die Struktur von NirDL aus *H. thermophilus*

Um die Struktur von NirDL aus *H. thermophilus* zu bestimmen, wurde das Protein von Dr. Stefan Schmelz und Theresa Kriegler vom HZI kristallisiert und röntgenkristallographisch untersucht.

Die Struktur von NirDL wurde mit einer Auflösung von 2 Å mittels SAD (*single-wavelength anomalous dispersion*) gelöst (Dr. Stefan Schmelz, Theresa Kriegler). Das anomale Signal wurde dabei durch Selenomethionin erzeugt. Die Daten zur Strukturauflösung und die Verfeinerungsstatistik sind im Anhang (siehe Tabelle A1) aufgelistet.

Die Gesamtstruktur von NirDL:

Die Struktur von NirDL aus *H. thermophilus* ist in Abbildung 27 dargestellt.

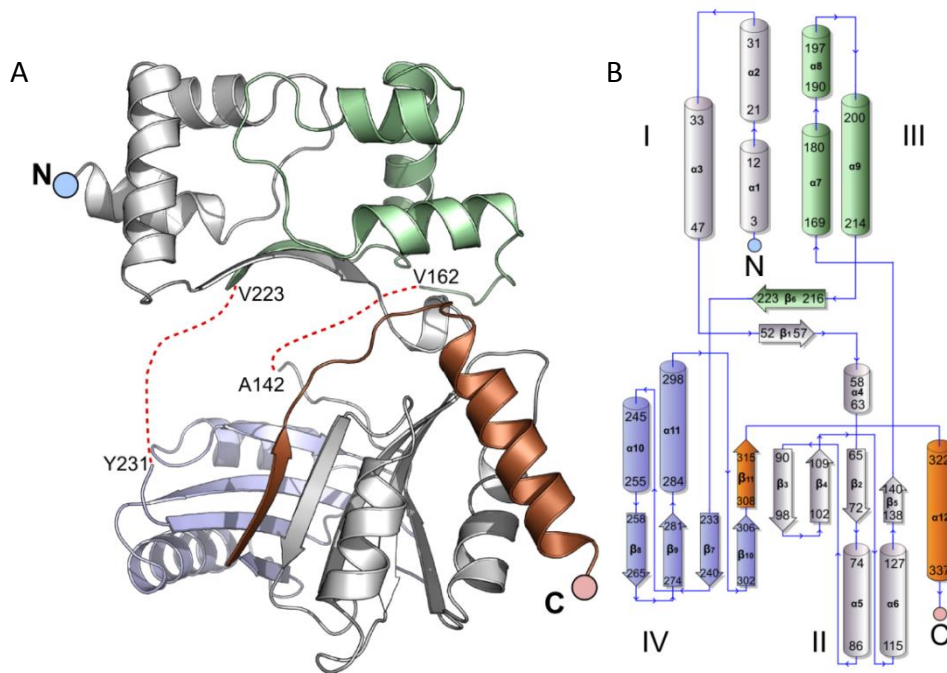


Abbildung 27: Kristallstruktur von NirDL aus *H. thermophilus*.

(A) Die Gesamtstruktur von NirDL mit dem Teil NirD (Aminosäurereste 1-142), dargestellt in grau und dem NirL-Teil (Aminosäurereste 162-337), farbig markiert. Die Aminosäuren zweier flexibler Loop-Strukturen konnten nicht gelöst werden und sind rot gestrichelt dargestellt. (B) Topologie-Diagramm von NirDL. α -Helices sind als Zylinder und β -Stränge als Pfeile dargestellt. Die Domänen sind mit I, II, III und IV markiert und die Farben entsprechen (A). (aus Haufschildt *et al.*, 2014)

Wird die Gesamtstruktur von NirDL betrachtet so kann diese in zwei homologe Hälften unterteilt werden, den NirD-Teil (grau) und den NirL-Teil (farbig). Diese beiden Teile sind in der Struktur X-förmig angeordnet. Jeder dieser Teile kann in zwei verschiedene Domänen aufgeteilt werden. Domäne I (Aminosäuren 1-57, NirD) und Domäne III

(Aminosäuren 162-223, NirL) bilden den oberen Teil des Proteins und bestehen jeweils aus drei α -Helices und einem β -Strang (siehe Abbildung 27B; $\alpha 1$ - $\alpha 3$ und $\alpha 7$ - $\alpha 9$ sowie $\beta 1$ & $\beta 6$). Die beiden Domänen I und III zusammen bilden die für Lrp/AsnC-Transkriptionsregulatoren typische DNA-Bindedomäne, das Helix-Turn-Helix-Motiv (Thaw *et al.*, 2006).

Die Domänen II (Aminosäuren 58-142, NirD) und IV (Aminosäuren 231-307, NirL), die den unteren Teil des Proteins darstellen, formen eine dimere *alpha-beta barrel*-Struktur, die unter anderem auch in der Familie der Lrp/AsnC-Transkriptionsregulatoren vorkommt. Die Domänen II und IV sind um 90° gegeneinander verdreht und bestehen aus jeweils zwei antiparallelen β -Faltblättern ($\beta 2$ - $\beta 5$ und $\beta 7$ - $\beta 10$), auf deren Außenseite sich zwei α -Helices ($\alpha 5$ - $\alpha 6$ und $\alpha 10$ - $\alpha 11$) befinden. Am Ende der Domäne IV sind ein zusätzlicher β -Strang ($\beta 11$, Aminosäuren 308-315), ein langer Loop (Aminosäuren 316-321) und eine α -Helix ($\alpha 12$, Aminosäuren 322-337) zu finden. Die Helix $\alpha 12$ befindet sich auf der äußeren Seite der Domäne II, sodass der Loop zusammen mit der Helix eine Art Klammer bildet, die die Domänen II und IV stabilisiert. Die Aminosäuren der zwei flexiblen Loop-Strukturen (Aminosäuren 143-161), die die Domänen II und III sowie (Aminosäuren 224-230) die Domäne III und IV miteinander verbinden, konnten nicht gelöst werden.

Die Bindung an DNA:

Zusätzlich zu den Ergebnissen, die in Kapitel 4.1 dargestellt sind, bestärkt die dreidimensionale Struktur die Hypothese, dass es sich bei NirDL nicht nur um ein Enzym handelt, das katalytisch an der Häm d_1 -Biosynthese beteiligt ist, sondern ebenfalls zu den Transkriptionsregulatoren gehört. Wie in Kapitel 1.6.5 beschrieben sind die Proteine NirDLGH aus *P. aeruginosa* und NirDL aus *H. thermophilus* aufgrund bioinformatischer Analysen als Transkriptionsregulatoren der Lrp/AsnC-Familie annotiert worden. In Abbildung 28 ist die mögliche Bindung des Proteins an die DNA dargestellt. Hierbei wurden die Domänen I und III von NirDL aus *H. thermophilus* strukturell mit dem Protein AhrC aus *B. subtilis* verglichen. AhrC ist ein Argininrepressor/-aktivator-Komplex, der mit der DNA kokristallisiert wurde (Garnett *et al.*, 2008). Es ist zu erkennen, dass sowohl AhrC als auch NirDL sechs α -Helices besitzen, die die DNA binden könnten. Die $\alpha 2$ - und $\alpha 8$ -Helices von NirDL sind deutlich kürzer als die entsprechenden von AhrC, sodass davon ausgegangen werden kann, dass NirDL bei der Bindung der DNA näher an diese heranreicht.

Dadurch könnten die beiden Helices tiefer in der großen Furche der DNA liegen. Um allerdings die genaue Lage und Position der Helices im Komplex mit der DNA zu bestimmen sollten Kokristallisationsexperimente mit der DNA *upstream* des *nirJ*-Gens durchgeführt werden.

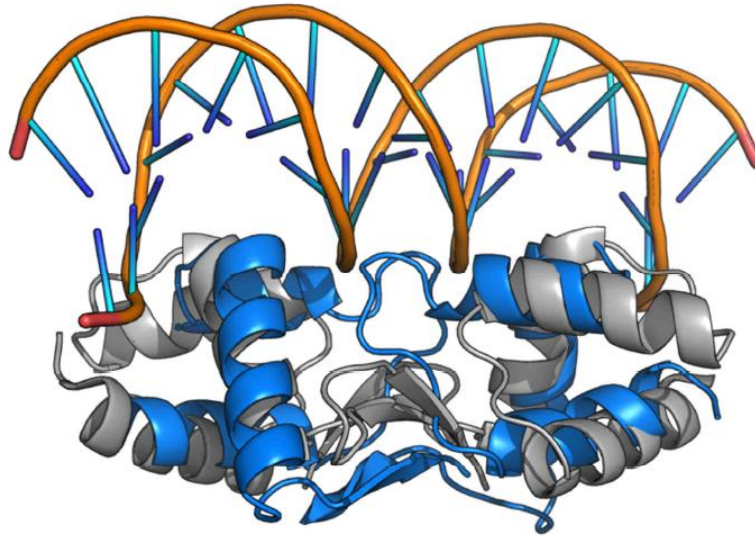


Abbildung 28: Helix-Turn-Helix-Motiv von NirDL im Vergleich zu AhrC aus *B. subtilis*.

Vergleich der Domänen I und III von NirDL aus *H. thermophilus* (blau) mit AhrC aus *B. subtilis* (grau). Die DNA wurde mit AhrC kokristallisiert. Die Bindemotive beider Proteine enthalten jeweils 6 α -Helices und zwei β -Stränge (nach Theresa M. Kriegler, 2012).

Der Komplex von NirDL mit Fe-Uroporphyrin III:

Um das aktive Zentrum von NirDL zu lokalisieren und mehr über die Decarboxylierungsreaktion herauszufinden, wurden Kokristallisationsexperimente mit dem Substratanalogon Fe-Uroporphyrin III (FeUroIII) durchgeführt. FeUroIII wurde anstelle des eigentlichen Substrats Sirohäm genutzt, weil Sirohäm unter Einfluss von Sauerstoff an den Ringen A und B zusätzliche Lacton-Ringe bildet. Das geschieht aufgrund der Acetat-, Methyl- und Propionatseitenketten. In Abbildung 29 sind das natürliche Substrat SH und das Substratanalogon zur besseren Übersicht dargestellt.

Die untere Hälfte der beiden Moleküle, an dem auch die Decarboxylierung stattfindet, ist identisch. In der oberen Hälfte unterscheiden sich die beiden Moleküle aufgrund der fehlenden Methylgruppen an den Ringen A und B. Dadurch kommt es auch zu einem Unterschied in dem Oxidationszustand der Pyrrolringe, Sirohäm besitzt ein teilweise gesättigtes Ringsystem, wohingegen das des FeUroIII ungesättigt ist.

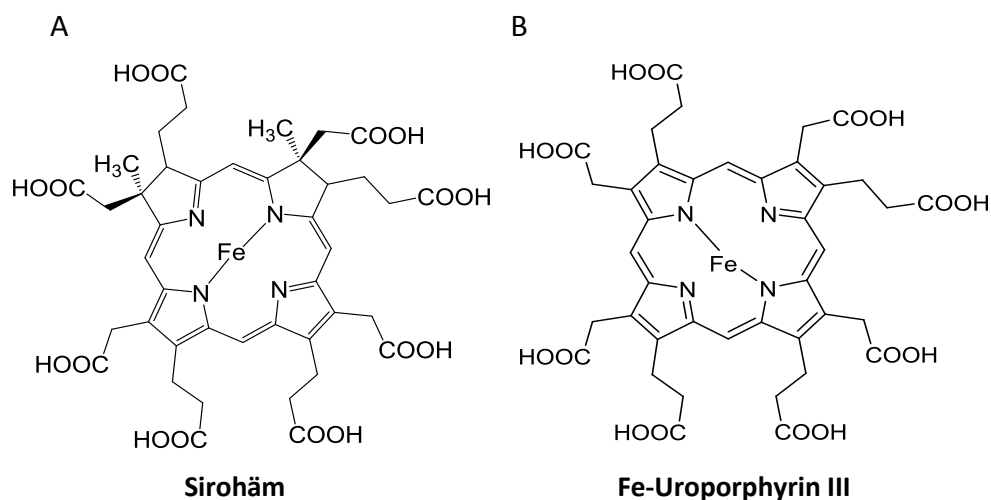


Abbildung 29: Strukturen des Substrats Sirohäm und dessen Analogons Fe-Uroporphyrin III.

(A) Das natürliche Substrat SH von NirDL und das Substratanalogon FeUroIII (B). Der untere Teil der Moleküle (Ringe C und D) ist identisch. An Ringen A und B fehlt dem Analogon jeweils eine Methylgruppe, was zum Ausbleiben der Lacton-Bildung unter Einfluss von Sauerstoff führt.

Aufgrund der Unempfindlichkeit von FeUroIII gegenüber Sauerstoff wurden die Kokristallisationsexperimente unter aeroben Bedingungen, wie im Falle der apo-NirDL, durchgeführt. Die Struktur wurde mittels molekularem Ersatz anhand der apo-Struktur von NirDL, gelöst (Dr. Stefan Schmelz, Theresa Kriegler). Durch die Elektronendichte und das anomale Signal des Eisens konnte die Lage des FeUroIII genau bestimmt werden.

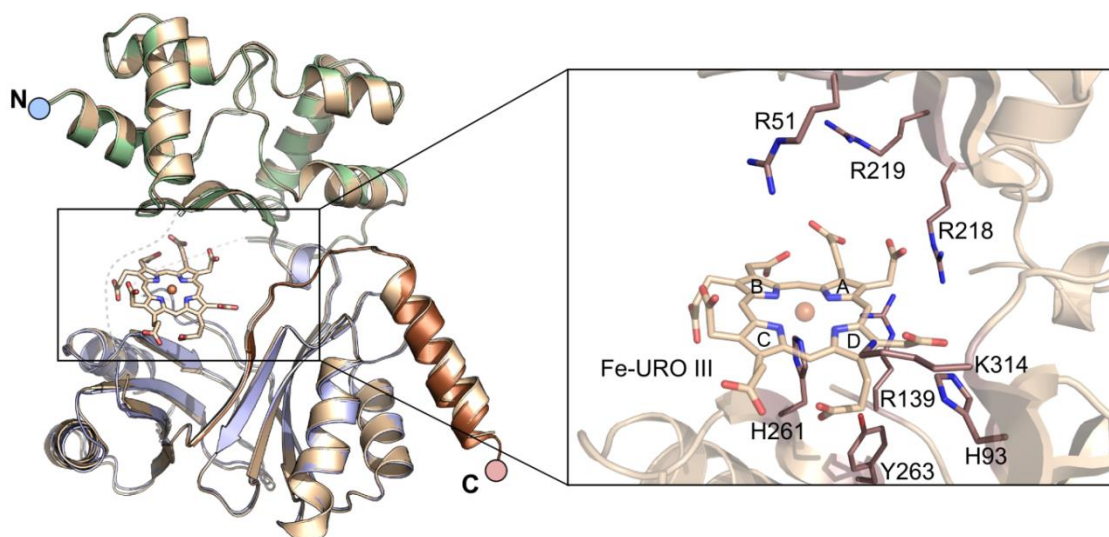


Abbildung 30: Die Struktur von NirDL im Komplex mit FeUroIII im Vergleich zur apo-Struktur von NirDL.

Die NirDL apo-Struktur (grün, flügel und rostrot) im Vergleich zur Struktur des Kokomplexes von NirDL (beige) und FeUroIII (beige). Der gezoomte Ausschnitt zeigt die Lage von FeUroIII im aktiven Zentrum von NirDL sowie die benachbarten Aminosäuren, die für die Positionierung des Substrats verantwortlich sind. (aus Haufschmidt *et al.*, 2014)

Die Abbildung 30 zeigt die Struktur des Komplexes von NirDL und FeUroIII im Vergleich zur apo-NirDL Struktur. Die apo-Struktur ist farbig und die Komplex-Struktur in beige dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Bindung des künstlichen Substrats, die Gesamtstruktur von NirDL nicht verändert hat. Es kam zu keiner Konformationsänderung des Proteins. Ebenso wie in der apo-Struktur waren auch im Komplex die beiden flexiblen Loops (Aminosäuren 143-161 und 224-230) nicht zu lösen.

Im aktiven Zentrum von NirDL befinden sich viele Arginine und Lysine (R51, R139, R218, R219 und K314), die eine positiv geladene Umgebung für das Substrat schaffen. Das Histidin-261 zeigt direkt auf das zentrale Eisenatom des Substrats, was die Vermutung nahe legt, dass dieses Histidin für die Koordination des Substrats im aktiven Zentrum zuständig ist. Außerdem zeigen die Reste der Aminosäuren Histidin-93 und Tyrosin-263 ebenfalls direkt auf das Substrat.

Im finalen Modell des Substratanalogons im aktiven Zentrum ragt der D-Ring weit in das aktive Zentrum hinein. Die Acetatseitenkette an Position C18 befindet sich dabei in der Nähe des hoch konservierten Histidin-93. Auch das Lysin-314 zeigt direkt auf dieses Acetat. Das ebenfalls hoch konservierte Tyrosin-263 könnte zusätzlich an der Positionierung des Substrats beteiligt sein, indem es eine Wasserstoffbrücke mit der Carboxylatgruppe der Propionatseitenkette an Ring D ausbildet. Ring A und C liegen auf der linken und der rechten Seite des aktiven Zentrums etwas weiter außerhalb. Diese beiden Ringe könnten durch die flexiblen Loops stabilisiert werden. Da diese aber nicht aufgelöst werden konnten, ist eine Aussage über Aminosäurereste, die an der Koordination beteiligt sind nur schwer möglich. In dem Loop, der von Aminosäure 141-161 reicht befinden sich keine hoch konservierten Reste. Dieser Loop könnte über den Ringen A und B liegen. In dem zweiten Loop befinden sich allerdings die konservierten Reste von Histidin-226 und Arginin-227, die mit Ring C interagieren könnten. Der Ring B von FeUroIII zeigt in der Struktur direkt zum Eingang des aktiven Zentrums. Die Arginine an den Positionen 139 und 218 könnten dafür zuständig sein die negative Ladung der Acetat- und Propionatseitenketten am A- und B-Ring zu kompensieren. Die Entfernung der beiden Argininreste ist allerdings zu weit für eine direkte Salzbrücke zu den Seitenketten. Diese Entfernung könnte bei der Bindung des natürlichen Substrats SH kürzer sein, aufgrund der unterschiedlichen Stereochemie. Wie oben bereits erwähnt, fehlen an den Ringen A und B des künstlichen Substrats am C2- und C7-Atom

jeweils eine Methylgruppe, was zu einer sp^2 -Hybridisierung der Atome C2, C3, C7 und C8 führt. Bei SH, dem natürlichen Substrat, sind diese sp^3 -hybridisiert.

Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass FeUroIII in der Struktur um 180° auf der vertikalen Achse gedreht, im aktiven Zentrum lag. In diesem Fall würde Ring C am weitesten in das aktive Zentrum ragen und Ring A die Position von Ring B sowie Ring C die Position von Ring D einnehmen. In der finalen Struktur wurde die Position des FeUroIII aufgrund der besseren Übereinstimmung der Acetat und Propionatseitenketten an Ring A und B, festgelegt. Da aber nicht die Lage aller Seitenketten des Tetrapyrrols aufgrund der Elektronendichte bestimmt werden konnte, sind beide Positionen denkbar. Die Erklärung für die ungenügende Elektronendichte der Seitenketten ist deren Flexibilität und die Beladung von nur 70-80 % des Proteins im Kristall mit FeUroIII.

Der Vergleich mit der Struktur der Sirohäm-Decarboxylase AhbA/B:

Die Struktur der Sirohäm-Decarboxylase AhbA/B aus *Desulfovibrio desulfuricans* wurde im Jahr 2014 von Palmer *et al.* veröffentlicht. *Desulfovibrio desulfuricans* ist ein sulfatreduzierendes Bakterium, das zur Biosynthese von Häm nicht den klassischen Weg von Uroporphyrinogen III über Coproporphyrinogen III, Protoporphyrinogen IX und Protoporphyrin IX zu Häm nutzt. Die Bildung von Häm verläuft hier über den alternativen Häm-Biosyntheseweg. Ebenso wie in der klassischen Biosynthese sind alle Vorstufen bis zum Uroporphyrinogen III vorhanden. Im Anschluss entstehen die Intermediate Precorrin-2, Sirohydrochlorin, Sirohäm, 12,18-Didecarboxy-Sirohäm, Fe-Coproporphyrin III und schließlich Häm. (Bali *et al.*, 2011)

Die Decarboxylierung von Sirohäm zu 12,18-Didecarboxy-Sirohäm übernimmt in diesem Biosyntheseweg die Sirohäm-Decarboxylase AhbA/B bestehend aus den Untereinheiten AhbA und AhbB. Die Struktur dieses Proteins im Komplex mit dem Produkt DDSH wurde im Laufe dieser Arbeit veröffentlicht (Palmer *et al.*, 2014).

Da AhbA/B dieselbe Reaktion katalysiert wie NirDL ist in Abbildung 31 der Vergleich der Strukturen von AhbA/B aus *Desulfovibrio desulfuricans* und NirDL aus *H. thermophilus* dargestellt. In Teil A der Abbildung sind die gesamten Strukturen übereinander gelegt und es ist deutlich zu erkennen, dass sich beide Strukturen sehr ähneln. Die ungefähre Lage und Länge der α -Helices und β -Stränge stimmen überein. AhbA nimmt die Position des NirD-Teils und AhbB die des NirL-Teils von NirDL ein.

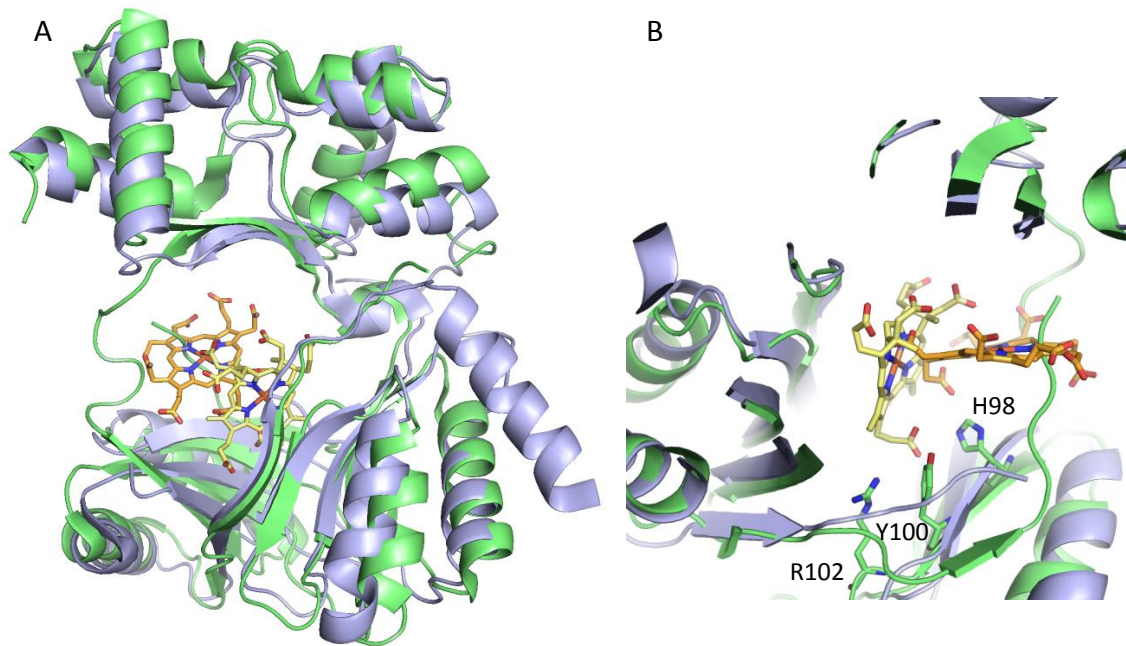


Abbildung 31: Strukturvergleich von AhbA/B mit Produkt und NirDL mit Substratanalogon.

(A) Alignment der Struktur von AhbA/B (grün) aus *Desulfovibrio desulfuricans* im Komplex mit dem Produkt DDSH (gelb) und NirDL (flüchtig) aus *H. thermophilus* im Komplex mit dem Substratanalogon FeUroIII (orange). (B) Die aktiven Zentren der Proteine mit dem gebundenen Produkt und Substratanalogon. Die Ansicht ist um 180° im Vergleich zu A gedreht. Die Aminosäuren H98, Y100 und R102 von AhbA/B sind als Sticks dargestellt. Die Farbgebung entspricht (A).

AhbA/B bildet ebenso wie NirDL ein Helix-Turn-Helix-Motiv am oberen Teil des Proteins aus. Hier unterscheiden sich die Länge und Lage der Helices leicht von denen in NirDL. In der Verbindungsregion zwischen dem oberen Helix-Turn-Helix-Motiv und der unteren katalytisch aktiven Region gelang es Palmer *et al.* die Aminosäurereste vollständig aufzulösen. Der untere katalytisch aktive Teil des Proteins, der die Bindestelle für das Substrat enthält, entspricht, was Lage und Sekundärstruktur angeht, ebenfalls dem von NirDL. AhbA besitzt allerdings am C-Terminus einen zusätzlichen β -Strang, der bei NirDL in dem nicht gelösten Bereich zwischen den Aminosäuren 142-162 liegen müsste. Es wäre also möglich, dass sich in diesem Bereich auch bei NirDL noch ein weiterer β -Strang befindet. Der lange Loop und die α -Helix 13 am C-Terminus der NirDL-Struktur, die die Klammer um den NirD-Teil bilden, sind in der Struktur von AhbB nicht vorhanden.

Der größte Unterschied liegt jedoch in der Lage des Produktes DDSH in der Struktur von AhbA/B im Vergleich zu der des künstlichen Substrat FeUroIII im Komplex mit NirDL. Während FeUroIII fast waagrecht im mittleren Bereich des aktiven Zentrums liegt, befindet sich DDSH nahezu senkrecht tief im hinteren Bereich des aktiven Zentrums. DDSH liegt mit der Rückseite zur Öffnung des aktiven Zentrums, sodass sich

der B-Ring links oben und der A-Ring rechts oben von der Öffnung aus gesehen, befindet. Eine Erklärung für die unterschiedliche Lage des Produkts und des Substrats in den beiden Strukturen könnte sein, dass es sich um einen Migrationsmechanismus vom gebundenen Substrat zum gebundenen Produkt handelt. Möglicherweise kann das künstliche Substrat von NirDL nicht umgesetzt werden, sodass es an der Substratbindeposition verbleibt. Dagegen ist in der Struktur von AhbA/B nur das Produkt gebunden, was eventuell die Endposition darstellt. Ebenso wäre es auch denkbar, dass es sich bei der Decarboxylierung des Substrates der beiden Proteine zwar um identische Prozesse handelt, die Proteine sich aber in der Bindung des Substrats unterscheiden. Der vermutlich evolutionär gemeinsame Vorläufer könnte durch Mutationen über die Zeit zur unterschiedlichen Bindung im aktiven Zentrum der beiden Proteine geführt haben. Auch zu bedenken gilt hier, dass sowohl AhbA/B als auch NirDL als jeweils einzige Sirohäm-Decarboxylase im jeweiligen Organismus vorzufinden ist. Somit müssen AhbA/B aus *Desulfovibrio desulfuricans* und NirDL aus *H. thermophilus* die Decarboxylierung beider C-Atome C12 und C18 vornehmen. Dies könnte zum einen durch gleichzeitige Decarboxylierung beider Seitenketten, Migration im aktiven Zentrum zu einer weiteren Bindestelle oder Erkennung zweier Substrate, dem Substrat SH und dem bis jetzt als Intermediat der Reaktion bezeichneten MDSH, stattfinden.

Basierend auf der Struktur von AhbA/B postulierten Palmer *et al.* ebenfalls welche Aminosäuren an der Koordination des Substrates und der Decarboxylierung von SH beteiligt sein könnten (siehe Abbildung 30B). So konnten sie zeigen, dass der Austausch der Aminosäure Arginin-102 von AhbB zu einer Inaktivierung des Proteins führte. Zusätzlich postulierten sie, dass neben R102 entweder H98 oder Y100 mit an der Decarboxylierung beteiligt sind. Dieses hoch konservierte Motiv aus HXYXR existiert sowohl in dem Protein AhbB als auch bei AhbA von Aminosäureposition 115-117. Genau dieses Motiv ist in NirDL ebenfalls zweimal zu finden, von Histidin-93 bis Arginin-97, das dem AhbA H115 bis R119 entspricht und Histidin-261 bis Arginin-265, das dem AhbB H98-R102 entspricht. Um die Bedeutung dieser Motive und die Übereinstimmung mit den Ergebnissen für AhbA/B zu überprüfen sowie genauere Aussagen zu dem Reaktionsmechanismus von NirDL treffen zu können, sollten im Anschluss Aminosäureaustauschstudien durchgeführt werden.

Zunächst wurde aber untersucht, ob NirDL das künstliche Substrat FeUroIII *in vitro* umsetzen kann.

4.3.4 Die Umsetzung des Substratanalogons FeUroIII durch NirDL

Da die Kokristallisation von NirDL mit dem Sirohäm Analogon FeUroIII erfolgreich war, sollte nun untersucht werden ob NirDL ebenfalls in der Lage ist dieses umzusetzen.

Dazu wurde der bereits etablierte Enzymaktivitätstest für NirDL aus *H. thermophilus* (siehe Kapitel 3.7.19) leicht abgewandelt. Anstatt des zellfreien CysG-Extraktes wurde hierbei 20 μ M FeUroIII zusammen mit dem Protein bei 60 °C für 2 Stunden anaerob inkubiert. Im Anschluss wurden die Tetrapyrrole extrahiert (Kapitel 3.7.15) und mittels HPLC analysiert (Kapitel 3.7.16).

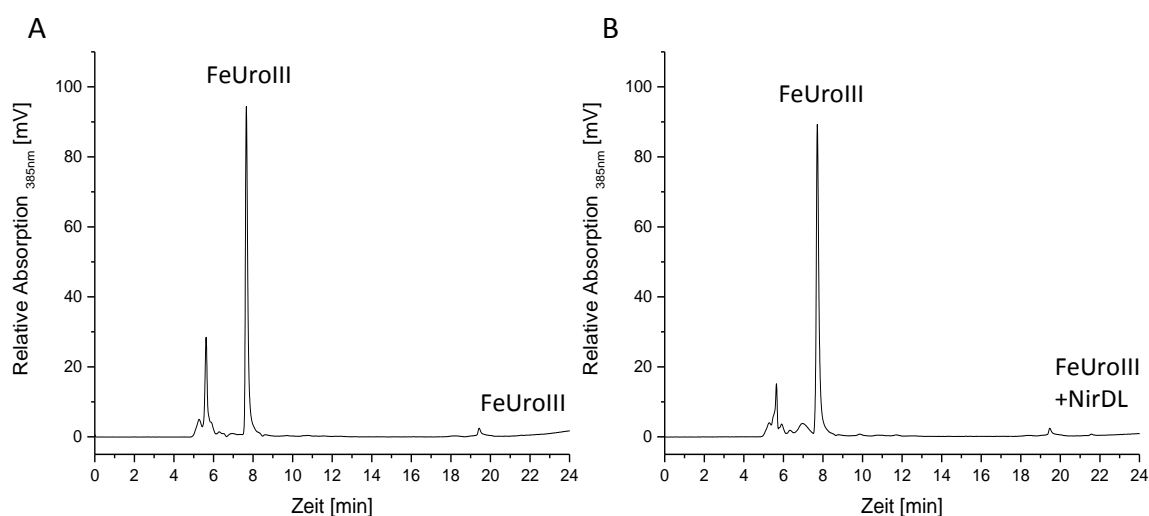


Abbildung 32: Chromatographische Analyse des *in vitro*-Enzymtests mit FeUroIII und NirDL.

Aufgetragen ist die relative Absorption bei 385 nm in Millivolt gegen die Retentionszeit in Minuten. Die Zeiten zwischen 24 und 56 Minuten sind nicht dargestellt. Der eluierte Stoff Eisen-Uroporphyrin III (FeUroIII) ist markiert. (A) Chromatographische Analyse der Negativkontrolle. In diesem Ansatz wurde das Substratanalogon für 2 h bei 60 °C in Enzymtestpuffer inkubiert. (B) Chromatographische Analyse der Probe welche zusätzlich zu dem Substratanalogon das gereinigte Protein NirDL enthielt.

In Abbildung 32 ist die chromatographische Analyse des *in vitro*-Tests von NirDL mit dem künstlichen Substratanalogon FeUroIII dargestellt. Teil A der Abbildung zeigt das Chromatogramm des Reaktionsansatzes, in dem nur das Substratanalogon FeUroIII mit Enzymtestpuffer anaerob inkubiert wurde. Das FeUroIII eluierte nach ca. 8 Minuten. Eine kleine Menge eines weiteren Stoffes eluierte nach 19,5 Minuten und wies dasselbe Spektrum wie FeUroIII auf. Teil B der Abbildung enthält das Chromatogramm des Enzymtestansatzes, in dem zusätzlich zum Substratanalogon das gereinigte Protein NirDL enthalten war. Auch hier war zu erkennen, dass das Substrat FeUroIII nach ca. 8 Minuten von der Säule eluierte und ein weiterer Stoff nach 19,5 Minuten erschien. Weder unterschieden sich die Mengen der eluierten Stoffe zwischen den beiden Ansätzen, noch konnten weitere Stoffe detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigte, dass

NirDL aus *H. thermophilus* nicht in der Lage war das künstliche Substrat FeUroIII umzusetzen.

Im Vergleich zu dem natürlichen Substrat SH fehlt dem Substratanalogon jeweils eine Methylgruppe am C2- und C7-Atom an Ring A und B. Dadurch war die Handhabung während der Kristallisation einfacher, allerdings könnte dies dazu geführt haben, dass dieses Substrat nicht umgesetzt wird. Es wäre möglich, dass das künstliche Substrat, durch die fehlenden Methylgruppen, in verschiedenen Orientierungen im aktiven Zentrum gebunden wird und es somit nicht zur Decarboxylierung kommt. Diese Vermutung wird auch durch die Ergebnisse aus Kapitel 4.3.3 gestützt. Hier war es nicht möglich zu bestimmen in welcher Orientierung FeUroIII genau im aktiven Zentrum lag, da die aufgenommene Elektronendichte nicht die Zuordnung aller Seitenketten zuließ. Zusätzlich hat das Fehlen der Methylgruppen einen Einfluss auf den Oxidationszustand der Pyrrolringe. Während bei FeUroIII alle Ringe oxidiert sind, sind der Ring A und Ring B von Sirohäm reduziert. Dies könnte dazu führen, dass wenn FeUroIII in der richtigen Orientierung im aktiven Zentrum gebunden wurde, es trotzdem nicht zur Decarboxylierung kommen kann, aufgrund der veränderten Elektronenverteilung. Dadurch könnte es zu einer veränderten Aktivierungsenergie kommen, wodurch die Reaktion nicht mehr katalysiert werden kann. Ebenso ist es denkbar, dass FeUroIII ungefähr wie SH im aktiven Zentrum liegt, dies durch die leichten Veränderungen aber nicht genau genug an den Positionen sitzt.

Um zur Bindung des Substrates und dem Reaktionsmechanismus genauere Aussagen zu treffen wurden im Weiteren Austausche einzelner Aminosäuren vorgenommen.

4.3.5 Die Varianten von NirDL aus *H. thermophilus*

Nachdem die Struktur von NirDL aus *H. thermophilus* aufgeklärt werden konnte, sollte nun die Bindung des Substrates und der Reaktionsmechanismus von SH zu DDSH durch den Austausch einzelner Aminosäuren untersucht werden.

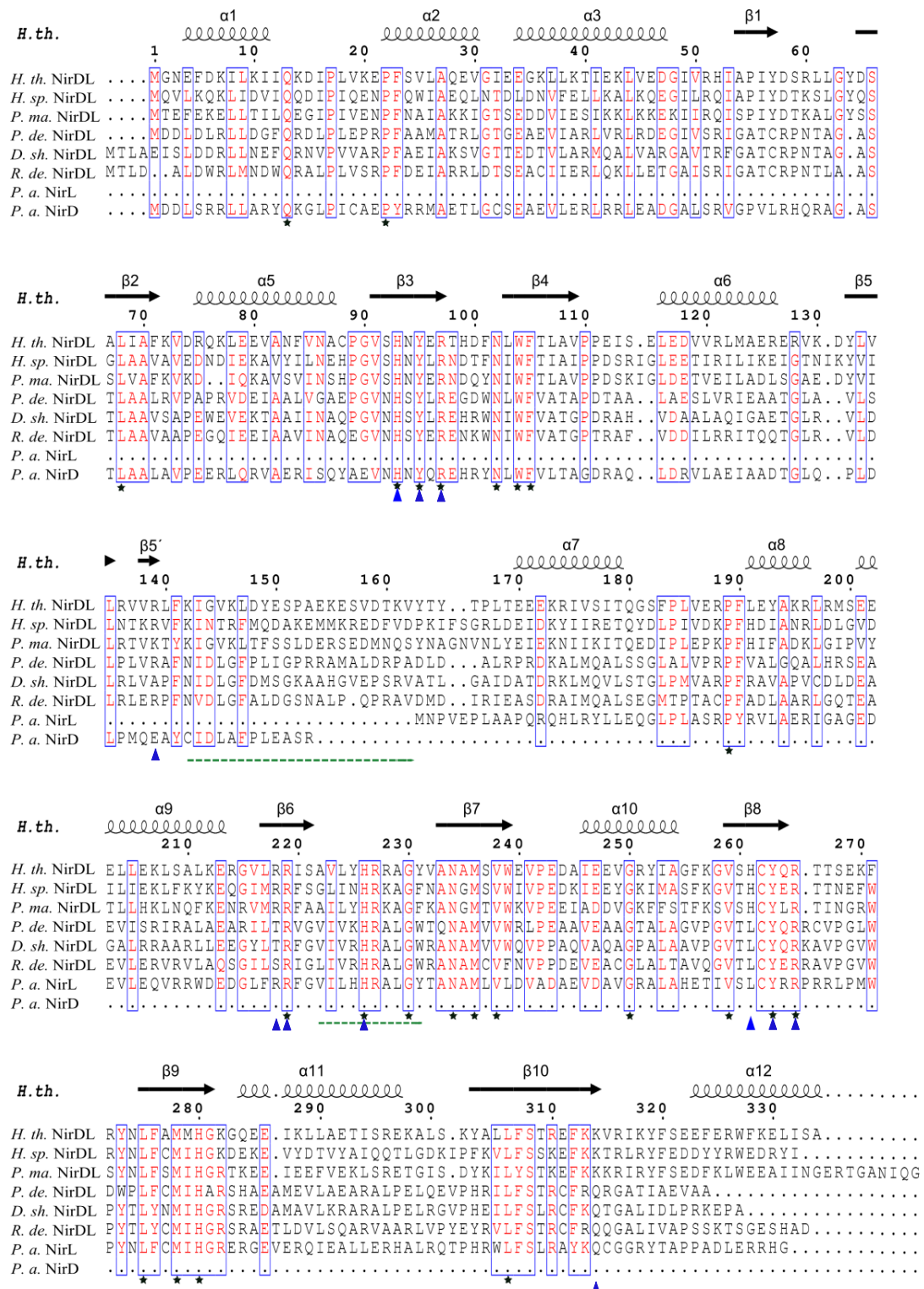


Abbildung 33: Strukturbasiertes Aminosäuresequenzalignement von NirDL verschiedener Organismen.

Alignment von NirDL aus *H. thermophilus* (*H. th.*) mit NirDL aus *Hydrogenobaculum sp.* Y04AAS1 (*H. sp.*), *Persephonella marina* (*P. ma.*), *P. denitrificans* (*P. de.*), *Dinoroseobacter shibae* (*D. sh.*), *Roseobacter denitrificans* (*R. de.*) und NirD und NirL aus *P. aeruginosa*. α -Helices und β -Faltblätter aus der Struktur von *H. thermophilus* sind über dem Alignement abgebildet. Die grüne, unterbrochene Linie markiert die flexiblen Bereiche, die in der Struktur nicht gelöst werden konnten. Konservierte Regionen sind durch rote Buchstaben und blaue Boxen dargestellt. Hoch konservierte Aminosäuren sind durch einen schwarzen Stern markiert. Die blauen Dreiecke heben die Aminosäuren, welche im Rahmen dieser Arbeit für Austauschstudien ausgewählt wurden, hervor.

Basierend auf der Komplexstruktur von NirDL mit dem Substratanalogon FeUroIII wurden Aminosäuren aufgrund ihrer Nähe zum FeUroIII ausgewählt. Diese könnten an der Koordination des Substrats im aktiven Zentrum und an der Decarboxylierung der Seitenketten am C12- und C18-Atom beteiligt sein. Zusätzlich dazu wurden die Aminosäuresequenzen von NirDL aus verschiedenen Organismen verglichen um eine geeignete Auswahl hoch konservierter Aminosäuren zu treffen.

Das strukturbasierte Aminosäuresequenzalignement von NirDL aus *H. thermophilus* (*H. th.*) mit NirDL aus *Hydrogenobaculum* sp. Y04AAS1 (*H. sp.*), *Persephonella marina* (*P. ma.*), *P. denitrificans* (*P. de.*), *Dinoroseobacter shibae* (*D. sh.*), *Roseobacter denitrificans* (*R. de.*) und NirD und NirL aus *P. aeruginosa* ist in Abbildung 32 dargestellt. Die Organismen *H. thermophilus*, *Persephonella marina* sowie *Hydrogenobaculum* sp. besitzen keine Gene für die Proteine NirG und NirH wohingegen die anderen aufgelisteten Organismen diese Gene besitzen. Es ist zu erkennen, dass etwa 32 % der Aminosäuren konserviert oder hoch konserviert sind. Diese sind durch schwarze Sterne (hoch konserviert) und durch rote Buchstaben sowie blaue Boxen markiert. Dabei handelt es sich meist um einzelne Aminosäuren und eher selten um eine längere Sequenz aus konservierten Aminosäuren. Auffällig ist der Bereich zwischen Aminosäure 148 und 182. In diesem Abschnitt befindet sich lediglich eine konservierte Aminosäure. Zum Teil liegt einer der flexiblen Loop-Bereiche in diesem Bereich, der in der Struktur von NirDL nicht gelöst werden konnte (markiert durch grüne unterbrochene Linie). Dieser Bereich scheint aufgrund seiner geringen Konservierung weder wichtig für die Bindung an die DNA noch für die Koordination oder Umsetzung des Substrates zu sein. Dasselbe scheint für den Endbereich des Proteins zu gelten von Aminosäure 287-304 sowie 314-334.

Außerdem fällt auf, dass ein Teil der Aminosäuren innerhalb der Organismen, die kein NirGH besitzen, hoch konserviert sind und innerhalb der Organismen, die NirGH produzieren, ebenso. Diese hoch konservierten Aminosäuren unterscheiden sich aber zwischen den beiden Gruppen. So befindet sich z.B. bei den Organismen die kein NirGH besitzen an Position 261 ein Histidin während die Organismen mit NirGH an dieser Stelle ein Leucin haben. Ebenso verhält es sich Lysin an Position 314. Die Organismen, die NirGH bilden, besitzen hier ein Glutamin. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Funktion der Proteine. Während das Protein NirDL ohne NirGH beide Decarboxylierungen durchführen und damit das Substrat in zwei verschiedenen

Orientierungen bzw. zwei unterschiedliche Substrate (SH und MDSH) binden muss, ist NirDL mit NirGH auf SH als Substrat spezialisiert.

Um nun eine geeignete Auswahl an Aminosäuren zu treffen wurden die Ergebnisse des Sequenzalignements mit der Struktur verglichen. Dabei entfielen bereits die konservierten Aminosäuren im Bereich 1-50 sowie 169-215, da sich dort die α -Helices befanden, die für die Interaktion mit der DNA zuständig waren. Hauptsächlich von Interesse waren die Aminosäuren, die im aktiven Zentrum lokalisiert sind. Die von Palmer *et al.* postulierten HXYXR-Motive wurden ebenfalls untersucht.

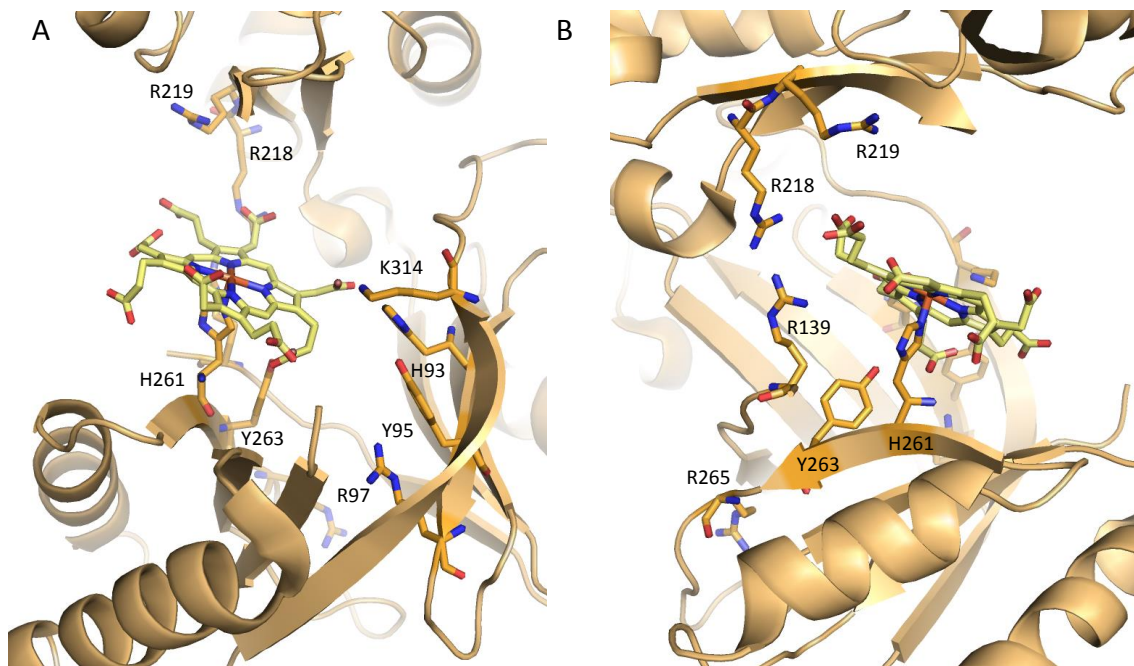


Abbildung 34: Das aktive Zentrum von NirDL mit FeUroIII und den zum Austausch ausgewählten Aminosäuren.

(A) Das aktive Zentrum von NirDL mit dem gebundenen künstlichen Substrat FeUroIII. Die Darstellung entspricht der in Abbildung 29 (frontal). Die aufgrund des Alignements und der Struktur ausgewählten Aminosäuren sind als Sticks in orange und das Tetrapyrrol FeUroIII in gelb dargestellt. (B) Darstellung entspricht (A) nur um 90° gedreht.

Die folgenden Aminosäuren wurden für den Austausch ausgewählt. Das Histidin-93 wurde zu Alanin (H93A), Serin (H93S) und Glutamin (H93Q), Tyrosin-95 zu Leucin (Y95L), Arginin-97 zu Lysin (R97K), Arginin-139 zu Alanin (R139A) und Lysin (R139K), Arginin-218 zu Alanin (R218A) und Lysin (R218K), Arginin-219 zu Glutamin (R219Q), Histidin-226 zu Glutamin (H226Q), Histidin-261 zu Alanin (H261A) und Serin (H261S), Tyrosin-263 zu Phenylalanin (Y263F), Arginin-265 zu Alanin (R265A) und Lysin (R265K), Lysin-314 zu Glutamin (K314Q), wie in Kapitel 3.6.15 beschrieben, mutiert (siehe Tabelle 8). Zusätzlich wurde eine Doppelvariante

erstellt. Dabei wurden Histidin-261 zu Leucin und Lysin-314 zu Glutamin, mutiert (H261L+K314Q). Mithilfe dieser Variante sollte untersucht werden, ob die Aktivität von NirDL aus *P. aeruginosa* durch NirDL aus *H. thermophilus*, nach empfunden werden kann, da es sich bei diesen beiden Aminosäuren um die oben beschriebenen Unterschiede zwischen NirDL aus Organismen ohne NirGH zu denen mit NirGH handelt.

Im Anschluss an die ortsgerichtete Mutagenese, die wie in Kapitel 3.6.13 beschrieben durchgeführt wurde, wurden die Sequenzen mithilfe der Firma GATC Biotech überprüft.

4.3.6 *In vitro*-Enzymaktivität der NirDL-Varianten

Nach erfolgreicher ortsgerichteter Mutagenese wurden die NirDL-Varianten nach demselben Protokoll produziert und gereinigt wie das Wildtyp-Protein (siehe Kapitel 3.7.4 und 3.7.6-3.7.8). Die Produktion und Reinigung der einzelnen Varianten erfolgte analog zum Wildtyp-Protein problemlos. Auch in der Löslichkeit war kein Unterschied festzustellen. Die Proteine wurden in anaeroben Puffer überführt (siehe Kapitel 3.7.13) und für den anaeroben *in vitro*-Enzymaktivitätstest eingesetzt (siehe 3.7.19). Im Anschluss wurden die Tetrapyrrole, wie in Kapitel 3.7.15 und 3.7.16 beschrieben, extrahiert und mittels HPLC analysiert. Hierbei sollte untersucht werden, ob es durch Austausch einer Aminosäure zu einer Beeinträchtigung der Enzymaktivität der NirDL-Varianten kommt. In diesem Falle könnte eine Aussage über die Beteiligung der betreffenden Aminosäure an der Decarboxylierung oder Koordination des Substrates im aktiven Zentrum getroffen werden.

Die Ergebnisse der chromatographischen Analysen der Tetrapyrrole der verschiedenen Enzymaktivitätstests zeigten, dass sich die unterschiedlichen NirDL-Varianten in drei Gruppen einsortieren ließen (siehe Abb. 35, 36 & 37). Für manche der NirDL-Varianten hatte der Austausch der Aminosäure keinen Einfluss auf die Enzymaktivität und diese wiesen somit eine Aktivität ähnlich der des Wildtyp-Proteins auf. Bei der zweiten Gruppe hatten die Aminosäureaustausche einen geringen Einfluss auf die Enzymaktivität und die Varianten zeigten eine ca. 50%ige Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Schließlich führte der Austausch mancher Aminosäuren in einigen NirDL-Varianten zu einer Inaktivierung der Enzyme.

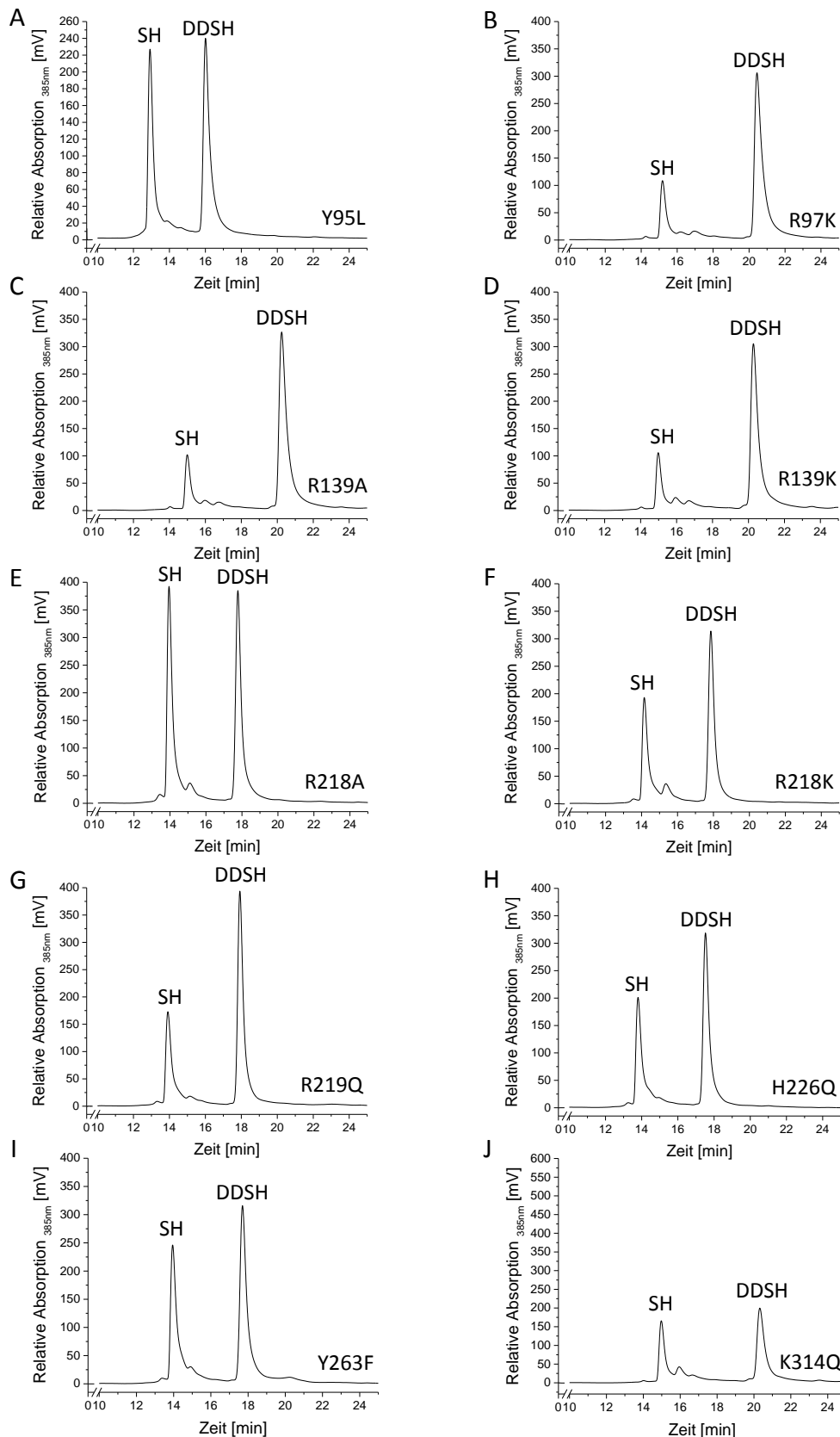


Abbildung 35: Chromatographische Analyse des Enzymaktivitätstests der NirDL-Varianten mit WT-ähnlicher Enzymaktivität.

Dargestellt ist die relative Absorption bei 385 nm in Millivolt gegen die Retentionszeit in Minuten. Die Zeiten zwischen 1 und 10 Minuten sowie 25 bis 51 Minuten sind nicht dargestellt. Die eluierten Tetrapyrrole Sirohäm (SH) und 12,18-Didecarboxy-Sirohäm (DDSH) sind markiert. Chromatographische Analyse des *in vitro*-Enzymaktivitätstests der NirDL-Varianten Y95L (A), R97K (B), R139A (C), R139K (D), R218A (E), R218K (F), R219Q (G), H226Q (H), Y263F (I) und K314Q (J).

Die leichten Unterschiede in den Retentionszeiten von SH und DDSH sind auf die verschiedenen Messzeitpunkte, zu denen die Untersuchungen durchgeführt wurden und den damit variierenden Resten die sich auf der Säule befanden, zurückzuführen. Der zeitliche Rahmen vom Wildtyp-Protein bis hin zur letzten untersuchten Variante betrug etwa 2 Jahre. Während dieser Zeit wurden knapp 200 HPLC-Läufe mit derselben Säule durchgeführt.

Ebenfalls durch die verschiedenen Messzeitpunkte lassen sich die Unterschiede in der eingesetzten SH-Menge erklären. Es mussten im Laufe der Zeit neue *E. coli*-CysG-Stämme hergestellt werden, was zu den verschiedenen Mengen an produziertem SH führte.

Aufgrund dieser Unterschiede in den Höhen und den Retentionszeiten wurde für jede Untersuchung der NirDL-Varianten das Wildtyp-Protein ebenfalls produziert, gereinigt und untersucht (Daten nicht gezeigt). Die Berechnung der Enzymaktivität in Prozent, die in Tabelle 8 dargestellt ist, wurde für jede Variante im Vergleich zu dessen Wildtyp-Protein durchgeführt.

In Abbildung 35 sind die chromatographischen Analysen der Tetrapyrrole der Enzymaktivitätstests für die NirDL-Varianten, für die der jeweilige Aminosäureaustausch keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hatte, dargestellt. Diese Gruppe umfasst die NirDL-Varianten Y95L (A), R97K (B), R139A (C), R139K (D), R218A (E), R218K (F), R219Q (G), H226Q (H), Y263F (I) und K314Q (J).

Bei allen in Abbildung 35 dargestellten chromatographischen Analysen der Tetrapyrrole aus den Enzymaktivitätstests eluierte das Substrat SH nach einer Retentionszeit von ca. 13-15 Minuten von der Säule. Der zweite Peak nach 16-20 Minuten stellte das Produkt der Reaktion DDSH dar. Die Menge des umgesetzten SH zu DDSH entsprach bei allen Varianten etwa der des ebenfalls untersuchten Wildtyps.

Es konnte gezeigt werden, dass die NirDL-Varianten Y95L, R97K, R139A, R139K, R218A, R218K, R219Q, H226Q, Y263F und K314Q in der Lage waren SH zu DDSH umzusetzen. Daraus ist abzuleiten, dass die entsprechenden Aminosäuren nicht essentiell für die Umsetzung von SH sind.

In Abbildung 36 ist die chromatographische Analyse der Tetrapyrrole aus den verschiedenen Enzymaktivitätstests der NirDL-Varianten dargestellt, für die der Austausch der Aminosäuren zu keiner oder nur einer sehr geringen Bildung des Produkts DDSH führte. Dazu gehörten die Varianten H93A (A), H93S (B), H93Q (C), H261A (D), H261S (E), R265A (F) sowie die Doppelvariante H261L+K314Q (G).

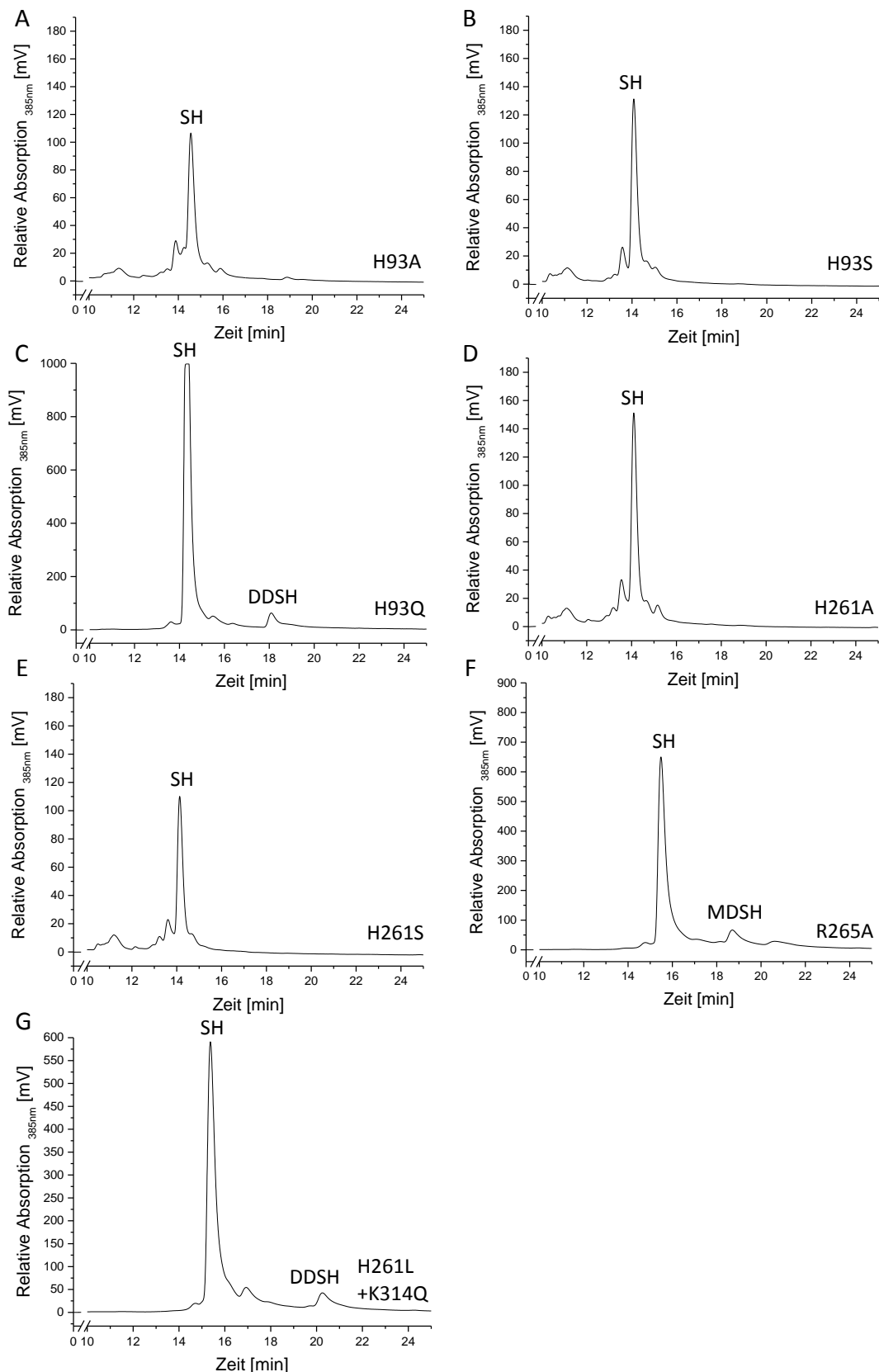


Abbildung 36: Chromatographische Analyse des Enzymaktivitätstests der NirDL-Varianten mit keiner oder sehr geringer Enzymaktivität.

Dargestellt ist die relative Absorption bei 385 nm in Millivolt gegen die Retentionszeit in Minuten. Die Zeiten zwischen 1 und 10 Minuten sowie 25 bis 51 Minuten sind nicht dargestellt. Die eluierten Tetrapyrrole Sirohäm (SH) und 12,18-Didecarboxy-Sirohäm (DDSH) sind markiert. Chromatographische Analyse des *in vitro*-Enzymaktivitätstests der NirDL-Varianten H93A (A), H93S (B), H93Q (C), H261A (D), H261S (E), R265A (F) und H261L+K314Q (G).

Bei allen in Abbildung 36 dargestellten Chromatogrammen eluierte das Substrat der Reaktion SH nach einer Retentionszeit von ca. 14-15 Minuten. Eine geringe Menge des Produkts DDSH war nur bei den Varianten H93Q (C), R265A (F) und H261L +K314Q (G) nach ca. 18-20 Minuten zu detektieren.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aminosäuren Histidin-93, Histidin-261 und Arginin-265 an der Decarboxylierung von Sirohäm oder der Koordination des Substrats im aktiven Zentrum beteiligt sind.

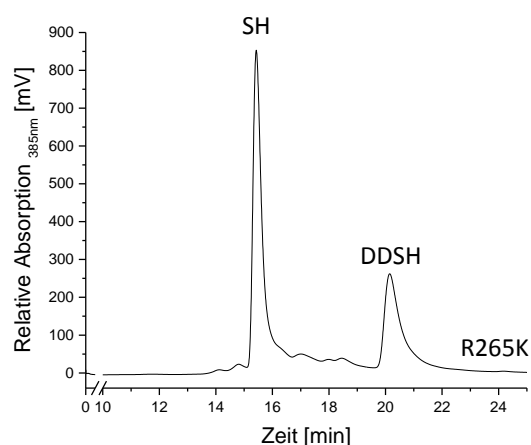


Abbildung 37: Chromatographische Analyse des Enzymaktivitätstests der NirDL-Varianten mit verringerter Enzymaktivität.

Dargestellt ist die relative Absorption bei 385 nm in Millivolt gegen die Retentionszeit in Minuten. Die Zeiten zwischen 1 und 10 Minuten sowie 25 bis 51 Minuten sind nicht dargestellt. Die eluierten Tetrapyrrole Sirohäm (SH) und 12,18-Didecarboxy-Sirohäm (DDSH) sind markiert. Chromatographische Analyse des *in vitro*-Enzymaktivitätstests der NirDL-Variante R265K.

In Abbildung 37 ist die chromatographische Analyse der Tetrapyrrole aus dem Enzymaktivitätstest der NirDL-Variante R265K dargestellt. Das NirDL-Substrat SH eluierte nach ca. 15 Minuten und das Produkt der Reaktion DDSH war nach 20 Minuten zu detektieren. Die gebildete Menge des Produkts DDSH lag bei etwa 50 % im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Der Austausch der Aminosäure Arginin-265 zu Lysin führte damit zu einer deutlich höheren Restenzymaktivität als der drastische Austausch gegen Alanin für die Variante R265A (siehe Abb. 36).

Die Auswirkungen der einzelnen Aminosäure-Varianten auf die Enzymaktivität lassen sich entweder auf die Beteiligung an der Decarboxylierung des Substrats oder auf die Beteiligung an der Koordination des Substrats im aktiven Zentrum zurückführen. Um letzteres zu überprüfen, wurden im Anschluss an die Enzymaktivitätstests Substratbindungstests durchgeführt.

4.3.7 Substratbindung des wt-NirDL und den NirDL-Varianten

Um die Substratbindung des NirDL-Wildtypproteins aus *H. thermophilus* und dessen Varianten zu untersuchen, wurden anaerobe Substratbindungsstudien durchgeführt. Aufgrund der Schwierigkeit das natürliche Substrat in großen Mengen zu extrahieren ohne es dem Einfluss von Sauerstoff auszusetzen, wurde für die Bindungsstudien das bereits bei der Kristallisation eingesetzte Substratanalogon FeUroIII genutzt. Hierzu wurde das gereinigte Protein (10 μM) mit derselben Konzentration FeUroIII versetzt und die Substrat-Enzym-Komplexbildung mittels UV/Vis-Spektroskopie verfolgt (siehe Kapitel 3.7.20).

In Abbildung 38 ist das UV/Vis-Spektrum der Negativkontrolle (freies FeUroIII) und des Bindungstestes von wt-NirDL aus *H. thermophilus* mit dem künstlichen Substrat FeUroIII dargestellt. Die gestrichelte Linie stellt die Negativkontrolle dar, die 10 μM FeUroIII in Tris-HCl pH 7,5 enthielt. Freies FeUroIII zeigte eine Soret-Bande bei 394 nm und kleinere Erhebungen bei 485, 532 und 600 nm. Die durchgezogene Linie stellt den Bindungstest von 10 μM FeUroIII zusammen mit 10 μM gereinigtem NirDL-Protein dar. In Anwesenheit des Wildtyp-Proteins verschob sich die Soret-Bande zu 404 nm und im höheren Wellenlängenbereich erschien nur noch eine Erhöhung bei 524 nm.

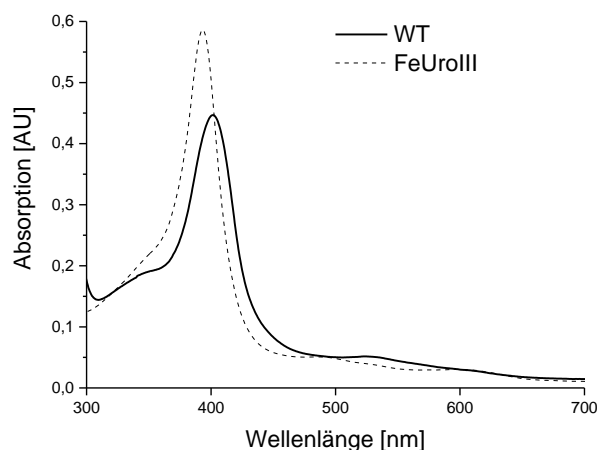


Abbildung 38: UV/Vis-Spektrum des wt-NirDL mit gebundenem FeUroIII und FeUroIII ohne Protein.

Aufgetragen ist die Absorption in AU gegen die Wellenlänge in Nanometern. Die Negativkontrolle FeUroIII ist gestrichelt dargestellt. Der Ansatz enthielt FeUroIII im Testpuffer. Die durchgezogene Kurve stellt die Probe mit FeUroIII und dem gereinigten WT-Protein NirDL, in äquimolaren Mengen, dar.

Es konnte damit gezeigt werden, dass das Wildtyp-Protein NirDL aus *H. thermophilus* *in vitro* in der Lage ist das künstliche Substrat FeUroIII zu binden und es dadurch zu

einer Verschiebung der Soret-Bande um ca. 10 nm und einer Veränderung der späteren Absorptionsbanden von 485, 532 und 600 nm zu einer bei 524 nm kommt.

Im Folgenden wurden nun die einzelnen NirDL-Varianten, die unter 4.3.5 beschrieben sind, auf ihre Fähigkeit das Substratanalogon FeUroIII zu binden, untersucht.

Wie bei den Enzymaktivitätsuntersuchungen der einzelnen Varianten lassen sich die Bindungsfähigkeiten der Proteine in Gruppen zusammenfassen.

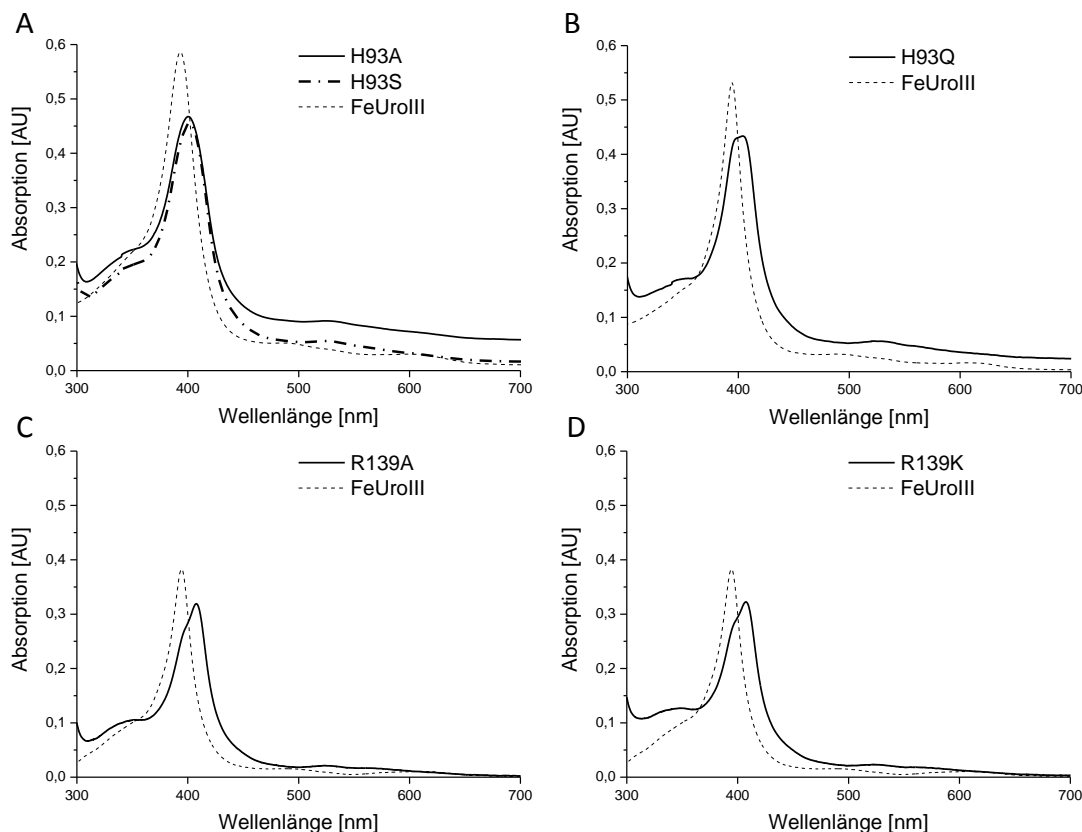


Abbildung 39: UV/Vis-Spektren der NirDL-Varianten H93A, H93S, H93Q, R139A und R139K mit FeUroIII.

Aufgetragen ist die Absorption in AU gegen die Wellenlänge in Nanometern. Die Negativkontrolle FeUroIII ist gestrichelt dargestellt. Der Ansatz enthielt FeUroIII im Testpuffer. (A) Die durchgezogene Kurve stellt die Probe mit FeUroIII und der NirDL-Variante H93A, die Kurve aus Strichen sowie Punkten die Variante H93S, in äquimolaren Mengen, dar. (B) Die Negativkontrolle ist ebenfalls gestrichelt und die Variante H93Q durchgezogen dargestellt. (C) Die durchgezogene Linie stellt die Variante R139A und (D) die Variante R139K dar.

In Abbildung 39 sind die UV/Vis-Spektren der NirDL-Varianten dargestellt, deren Aminosäureaustausch keinen Einfluss auf die Bindung des FeUroIII hatte. Das Spektrum der Negativkontrolle FeUroIII (gestrichelte Linie) ergab das bekannte Profil mit der Soret-Bande bei 394 nm sowie kleineren Banden bei 485, 532 und 600 nm. Die Spektren der verschiedenen Varianten mit einem Austausch der Aminosäure Histidin-93 waren identisch. Durch die Bindung des FeUroIII an das Protein verschob sich die Soret-Bande zu 404 nm, die Banden bei 485, 532 und 600 nm

verschwanden und eine neue Bande bei 524 nm erschien. Die beiden Varianten mit einem Austausch der Aminosäure Arginin-139 zeigten ein ähnliches Profil wie die der Histidinvarianten nur dass hier zusätzlich eine Schulter bei 394 nm zu erkennen war. Eine Erklärung hierfür wäre die Substratanalogon-Lösung. Diese musste im Laufe der Zeit erneuert werden, sodass es auch bei der Bindung von FeUroIII durch das Wildtyp-Protein zur Bildung dieser Schulter kam. Das Einsetzen von nicht genau äquimolaren Mengen könnte dafür verantwortlich sein.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Varianten H93A, H93S, H93Q, R139A und R139K dieselben Eigenschaften bei der Bindung des Substratanalogons haben wie das Wildtyp-Protein.

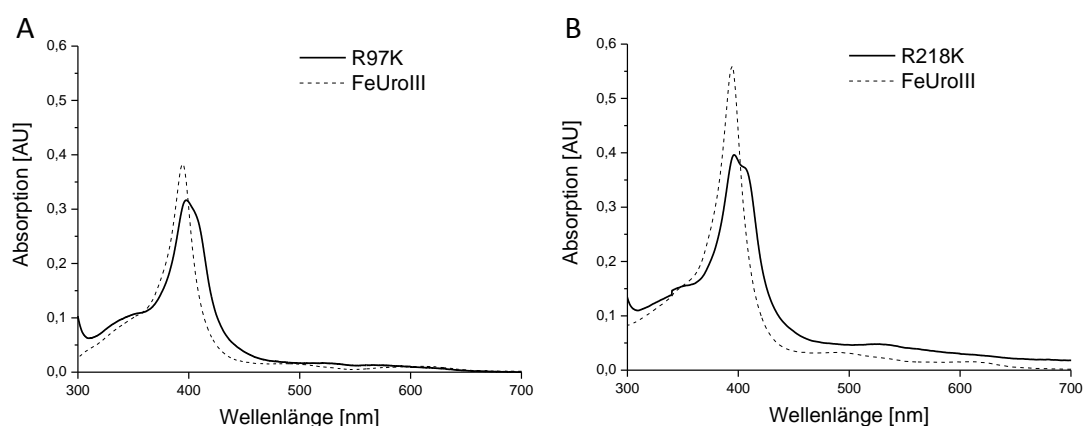


Abbildung 40: UV/Vis-Spektren der NirDL-Varianten R97K und R218K mit FeUroIII.

Aufgetragen ist die Absorption in AU gegen die Wellenlänge in Nanometern. (A) Die Negativkontrolle FeUroIII ist gestrichelt dargestellt. Der Ansatz enthielt FeUroIII im Testpuffer. Die durchgezogene Kurve stellt die Probe mit FeUroIII und der NirDL-Variante R97K, in äquimolaren Mengen, dar. (B) Die Negativkontrolle ist ebenfalls gestrichelt und die Variante R218K durchgezogen dargestellt.

In Abbildung 40 sind die UV/Vis-Spektren der Varianten R97K (A) und R218K (B) im Vergleich zur Negativkontrolle FeUroIII dargestellt. Diese beiden Proteine bilden die zweite Gruppe. Bei dieser hatte der Austausch der Aminosäure einen gewissen Einfluss auf die Fähigkeit das Substratanalogon zu binden. Die beiden Varianten zeigten eine geteilte Soret-Bande bei 394 nm und 404 nm. Auch der Bereich bei höheren Wellenlängen zeigte eine Mischung des Profils von gebundenem und ungebundenem FeUroIII. Hierbei waren die Erhöhungen bei 485, 532 und 600 nm (freies FeUroIII) sowie bei 524 nm (gebundenes FeUroIII) schwach bis gar nicht ausgeprägt. Im Vergleich zum Wildtyp-Protein haben die beiden Varianten R97K und R218K eine leicht verringerte Fähigkeit, das Substratanalogon zu binden.

In der Abbildung 41 sind die Spektren von FeUroIII als Negativkontrolle und zusammen mit den NirDL-Varianten Y95L, R218K, R219Q, Y263F und K314Q dargestellt.

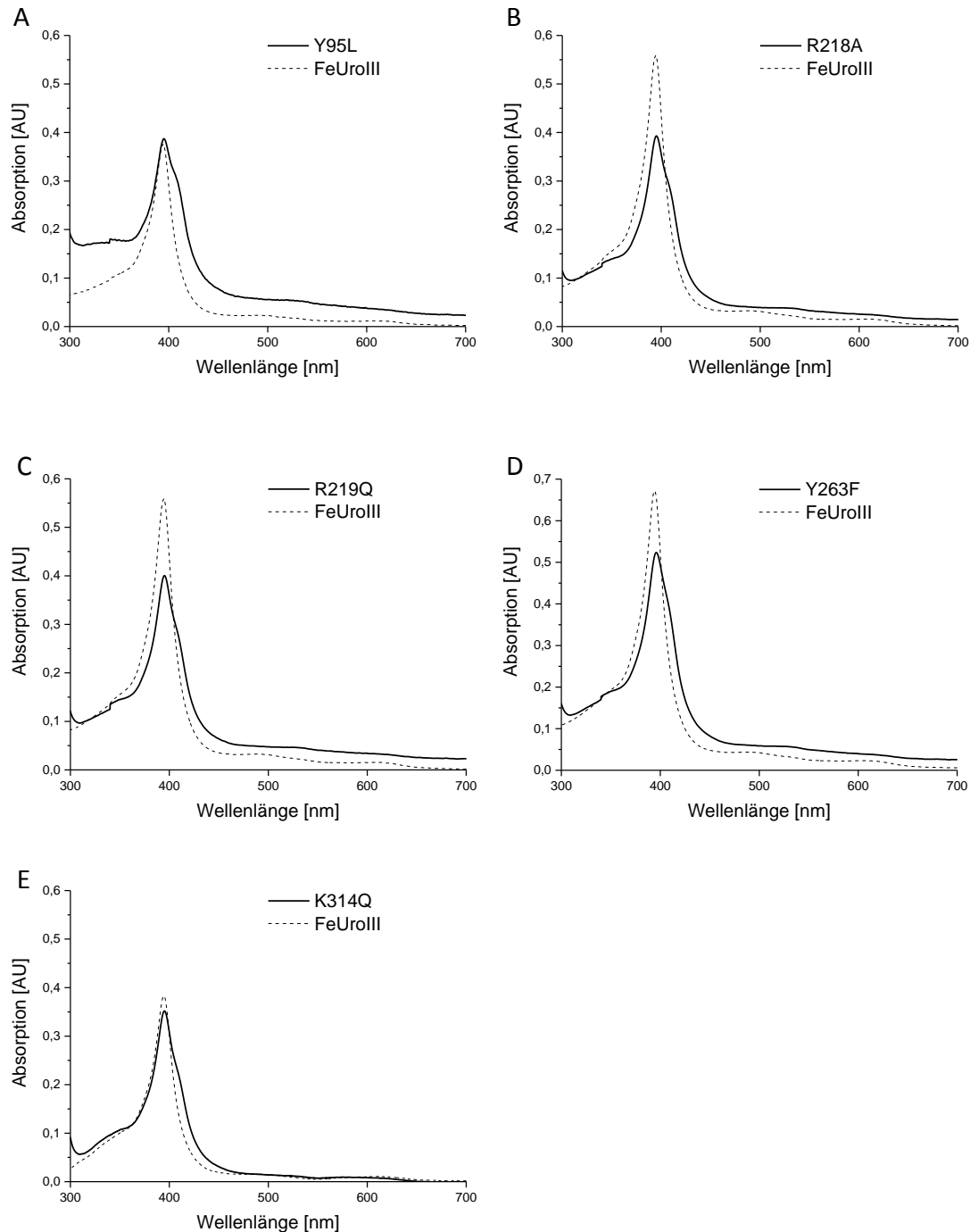


Abbildung 41: UV/Vis-Spektren der Varianten Y95L, R218A, R219Q, Y263F und K314Q mit FeUroIII.

Aufgetragen ist die Absorption in AU gegen die Wellenlänge in Nanometern. Die Negativkontrolle FeUroIII ist gestrichelt dargestellt. Der Ansatz enthielt FeUroIII im Testpuffer. Die durchgezogene Kurve stellt die Probe mit FeUroIII und den NirDL-Varianten Y95L (A), R218A (B), R219Q (C), Y263F (D) und K314Q (E), in äquimolaren Mengen, dar.

Bei allen abgebildeten NirDL-Varianten war die Soret-Bande bei 394 nm noch deutlich zu erkennen, was freiem FeUroIII entspricht. Zusätzlich dazu konnte aber ebenfalls eine Schulter bei 404 nm detektiert werden. Diese entspricht der Soret-Bande von gebundenem FeUroIII. Auch im Bereich von höheren Wellenlängen schien sich das Profil von gebundenem und freiem FeUroIII zu überlagern.

Damit konnte gezeigt werden, dass die NirDL-Varianten Y95L, R218K, R219Q, Y263F und K314Q eine stark eingeschränkte Bindefähigkeit von FeUroIII aufweisen im Vergleich zum Wildtyp.

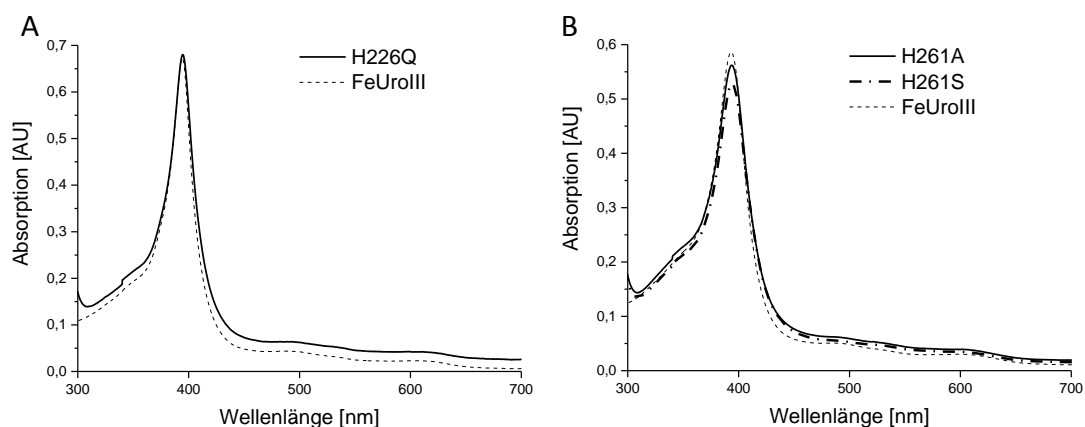


Abbildung 42: UV/Vis-Spektren der Varianten H226Q, H261A und H261S mit FeUroIII.

Aufgetragen ist die Absorption in AU gegen die Wellenlänge in Nanometern. (A) Die Negativkontrolle FeUroIII ist gestrichelt dargestellt. Der Ansatz enthielt FeUroIII im Testpuffer. Die durchgezogene Kurve stellt die Probe mit FeUroIII und der NirDL-Variante H226Q, in äquimolaren Mengen, dar. (B) Die Negativkontrolle ist ebenfalls gestrichelt, die Variante H261A durchgezogen und H261S mit Punkten und Strichen dargestellt.

Die Abbildung 42 zeigt das UV/Vis-Spektrum des freien FeUroIII (Strichlinie) sowie von FeUroIII in Anwesenheit der Histidin-Varianten H226Q (Abb. 42A, Volllinie), H261A (Abb. 42B, Volllinie) und H261S (Abb. 42B, Strich-Punktlinie). Diese Abbildung zeigt die letzte Gruppe der NirDL-Varianten, die keine Fähigkeit zur Bindung des FeUroIII besaßen.

Das Spektrum des freien FeUroIII zeigte, wie bereits beschrieben, die Absorptionsbanden 394, 485, 532 und 600 nm. Auch alle Spektren in denen Proteine enthalten waren entsprachen dem Spektrum von freiem FeUroIII.

Somit konnte gezeigt werden, dass der Austausch der Aminosäuren Histidin-226 und Histidin-261 dazu führte, dass die Proteine nicht mehr in der Lage waren das Substratanalogon FeUroIII zu binden.

Die Varianten R265A, R265K sowie die Doppelvariante K314Q+H261L wurden zwar ebenfalls auf ihre Bindung von FeUroIII untersucht, durch unglückliche Umstände

wurden allerdings die Originaldaten gelöscht, sodass diese Untersuchungen wiederholt werden müssen.

4.3.8 Beteiligung der Aminosäuren an Koordination oder Decarboxylierung des Substrats SH

Um die Rolle der einzelnen Aminosäuren bei der Koordination des Substrats oder der Decarboxylierung von SH übersichtlicher darzustellen und zu diskutieren, wurden die Ergebnisse aus den beiden Kapiteln 4.3.6 und 4.3.7 zusammen in der folgenden Tabelle 8 abgebildet.

Tabelle 8: Katalytische Aktivität und FeUroIII-Bindung von wt-NirDL aus *H. thermophilus* und den NirDL-Varianten.

NirDL-Varianten	Sirohäm-Decarboxylase-Aktivität (%)		FeUroIII-Bindung ^c
	DDSH ^a	MDSH ^b	
NirDL wt	100	2,9	+++
H93A	0-5	0	+++
H93S	0-3,7	0	+++
H93Q	6,6	5,5	+++
Y95L	100	3,4	+
R97K	100	2,7	++
R139A	100	3,2	+++
R139K	100	4,8	+++
R218A	100	7,2	+
R218K	100	9,9	++
R219Q	100	5,5	+
H226Q	100	0	-
H261A	0-5	0	-
H261S	0-4,8	0	-
Y263F	100	5,3	+
R265A	2,7	6,2	Keine Ergebnisse
R265K	53,1	3,6	Keine Ergebnisse
K314Q	100	6,9	+
H261L+ K314Q	4,1	4,3	Keine Ergebnisse

^a Die Menge des ermittelten DDSH im Verhältnis zur Gesamtmenge an SH, MDSH und DDSH. Die berechnete Menge des Wildtyps wurde als 100 % gesetzt und die der Varianten danach berechnet.

^b Die Menge des ermittelten MDSH im Verhältnis zur Gesamtmenge an SH, MDSH und DDSH.

^c +++ steht für komplette Bindung, ++ steht für leicht reduzierte Bindung, + steht für stark reduzierte Bindung, - steht für keine Bindung. Bei den Angaben handelt es sich um Schätzwerte.

Die Decarboxylase-Aktivität ist in Prozent im Vergleich zum Wildtyp-Protein angegeben. Dazu wurde die Fläche der einzelnen aufgetretenen Peaks bestimmt und die Menge von DDSH oder MDSH im Verhältnis zur Gesamtmenge an SH, MDSH und DDSH bestimmt. Für DDSH wurde zusätzlich die gebildete Menge des Wildtyps auf 100 % gesetzt und die Werte für die Varianten danach berechnet.

Die NirDL-Varianten H93A und H93S waren beide nicht in der Lage SH zu DDSH umzusetzen. Auch die Variante H93Q bildete nur eine sehr geringe Menge DDSH. In der Untersuchung der Bindefähigkeit von FeUroIII durch diese Proteine zeigten alle untersuchten Histidin-93-Varianten eine Wildtyp-ähnliche Bindefähigkeit, was darauf hinweist, dass dieses Histidin direkt an der Decarboxylierung von SH beteiligt ist. Auch in der NirDL-Struktur (siehe Kapitel 4.3.3) liegt der Aminosäurerest in der Nähe der Acetatseitenkette des D-Rings.

Die NirDL-Varianten Y95L und R97K zeigten eine leichte bis stark eingeschränkte FeUroIII-Bindung. Die Enzymaktivität lag allerdings auf Wildtypniveau. Damit ist davon auszugehen, dass die Aminosäuren Tyrosin-95 und Arginin-97 an der Bindung des Substrats im aktiven Zentrum beteiligt, sie aber nicht essentiell für die Enzymaktivität sind. Diese Aminosäuren gehören mit dem Histidin-93 zu einem der beiden hoch konservierten HXYXR-Motive. In diesem Motiv, das die Aminosäuren 93-97 umfasst, ist lediglich das Histidin-93 essentiell für die Enzymaktivität, wohingegen Tyrosin-95 und Arginin-97 an der Substratbindung beteiligt sind.

Der Austausch der Aminosäure Arginin-139 zu Alanin und Lysin hatte keinen Einfluss auf die Enzymaktivität und ebenso wenig auf die Fähigkeit FeUroIII zu binden. Das Arginin-139 liegt in der NirDL-Struktur in der Nähe der Acetat- und Propionatseitenketten des A- und B-Rings. Diese Aminosäure scheint aber weder an der Bindung noch an der Umsetzung des Substrats beteiligt zu sein.

Die Arginine-218 und -219 liegen ebenfalls in der Nähe der Acetat- und Propionatseitenketten des A- und B-Rings. Der Austausch dieser Aminosäuren hatte keinen Einfluss auf die Enzymaktivität der Proteine, allerdings war die Bindefähigkeit leicht bis stark eingeschränkt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aminosäuren Arginin-218 und Arginin-219 an der Kompensation der negativen Ladung der Seitenketten am A- und B-Ring beteiligt sind. Der größere Einfluss der Aminosäureaustausche zu Alanin und Glutamin im Vergleich zu Lysin lässt sich dadurch erklären, dass es sich bei Lysin wie bei Arginin um eine positiv geladene Aminosäure handelt. Alanin und Glutamin hingegen sind ungeladen.

Das Histidin-226 ist wichtig für die Bindung des Substrats im aktiven Zentrum. Die NirDL-Variante H226Q war nicht in der Lage das Substratanalogon FeUroIII zu binden. Allerdings zeigte der Aminosäureaustausch keinen Einfluss auf die Enzymaktivität des Proteins. Über die genaue Lage dieses Histidins lässt sich keine Aussage treffen, da es sich in dem nicht sichtbaren Loop der NirDL-Struktur befand. Möglicherweise könnte es aber zur Koordination des C-Rings beitragen.

Die Varianten H261A und H261S waren nicht in der Lage die Decarboxylierung von SH zu DDSH zu katalysieren. Ebenso konnte keine Bindung des FeUroIII festgestellt werden. Damit wurde gezeigt, dass das Histidin-261 für die Koordination des Substrats im aktiven Zentrum zuständig ist. In der NirDL-Struktur zeigt dieses Histidin direkt auf das zentrale Eisenatom des Substrats, sodass ohne das Histidin-261 weder Substrat gebunden noch umgesetzt werden kann.

Die NirDL-Variante Y263F bei der das Tyrosin gegen ein Phenylalanin ersetzt wurde, konnte FeUroIII noch binden, obwohl diese Fähigkeit eingeschränkt war. Die Variante war während des Sirohäm-Decarboxylase-Aktivitätstests auch weiterhin in der Lage SH zu DDSH umzusetzen. Das weist darauf hin, dass das Tyrosin-263 zwar an der Koordination des Substrats beteiligt zu sein scheint, es aber nicht essentiell für die Bindung bzw. Umsetzung ist. In der NirDL-Struktur liegt dieses Tyrosin so, dass es eine Wasserstoffbrücke zu der Propionatseitenkette des D-Rings bilden kann.

Die NirDL-Variante R265A konnte kein DDSH bilden, die Variante R265K hingegen war dazu in der Lage. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der drastische Aminosäureaustausch zu Alanin, das Protein inaktivierte und der Austausch zu Lysin mit ähnlichen chemischen Eigenschaften wie Arginin, eine gewisse Aktivität erhielt. Bei Arginin und Lysin handelt es sich um basische, hydrophile Aminosäuren, die auch eine ähnliche Länge aufweisen. Da aber der drastische Austausch zu Alanin zur Inaktivierung führte, kann darauf geschlossen werden, dass auch die Aminosäure Arginin-265 an der Koordination oder der Decarboxylierung des Substrats SH beteiligt ist. Da leider keine Daten über die FeUroIII-Bindefähigkeit der Proteine vorliegen, kann keine genauere Aussage getroffen werden.

Das Histidin-261, das Tyrosin-263 und das Arginin-265 gehören zu dem zweiten hoch konservierten HXYXR-Motiv und ebenso wie im ersten Motiv von H93-R97 scheint neben dem Arginin gerade das Histidin eine essentielle Rolle für die Umsetzung des Substrats SH zu spielen.

Die NirDL-Varianten K314Q und H261L+K314Q wurden erstellt um die Aktivität der Proteine NirDLGH aus *P. aeruginosa* in dem Protein NirDL aus *H. thermophilus*

nachzustellen. NirDL aus *P. aeruginosa* besitzt an der Position, die der von K314 entspricht, anstatt eines Lysins ein Glutamin und an der Position, die der von H261 entspricht, ein Leucin anstelle eines Histidins. Diese Veränderungen wurden durch die Aminosäureaustausche auf NirDL aus *H. thermophilus* übertragen.

Der Austausch der Aminosäure Lysin-314 hatte keinen großen Einfluss auf die Aktivität des Proteins. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Aminosäure nicht an der Bindung oder Umsetzung des Substrats beteiligt ist. Interessant erscheint allerdings die Doppelvariante H261L+K314Q, da der einzelne Austausch der Aminosäure Lysin-314 keinen Einfluss auf die Aktivität des Proteins hatte, die Doppelvariante hingegen nur noch eine sehr geringe Restaktivität aufwies. Die geringe Aktivität lässt sich aber anhand der Ergebnisse für die Einzelvarianten der Aminosäure Histidin-261 erklären. Alle durchgeführten Austausche dieser Aminosäure haben gezeigt, dass das mutierte Protein keine oder nur noch eine sehr geringe Decarboxylase-Aktivität besaß. Der Versuch die Aktivität von NirDL, die überwiegende Bildung von MDSH, aus *P. aeruginosa* in NirDL aus *H. thermophilus* nachzustellen war nicht erfolgreich. Die stark reduzierte Bindefähigkeit der Variante K314Q hingegen deutet darauf hin, dass diese Aminosäure vermutlich an der Koordination des Substrats oder der Kompensation der negativen Ladung einer der Seitenketten beteiligt ist, aber nicht für Umsetzung von SH zuständig ist. Was ebenfalls für eine zweitrangige Rolle des Lysins-314 spricht, ist, dass die Organismen, die NirG und NirH besitzen, an dieser Stelle ein Glutamin haben und diese Aminosäure nicht hoch konserviert ist. Eine Untersuchung der Bindungsfähigkeit der Doppelvariante fehlt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass viele der Aminosäureaustausche einen Einfluss auf die Bindung von FeUroIII hatten, im Gegensatz dazu jedoch nur geringe Auswirkungen auf die Enzymaktivität zeigten. Hierbei muss allerdings erwähnt werden, dass es sich bei dem Enzymaktivitätstest um eine Endpunktbestimmung handelte. Die Bestimmung von spezifischen Aktivitäten zu Beginn der Reaktion hätte eventuell einen genaueren Einblick in die Geschwindigkeiten der Reaktionen ermöglicht.

Zudem sei noch einmal erwähnt, dass es sich bei FeUroIII nicht um das natürliche Substrat von NirDL sondern um ein Analogon mit Veränderungen an den A- und B-Ringen handelte. So wäre es auch möglich, dass die Aminosäureaustausche einen etwas anderen Einfluss auf die Bindung von SH haben.

Es gibt aber auch die Möglichkeit, dass es durch die einzelnen Aminosäureaustausche zu einer Konformationsänderung des Proteins gekommen ist. Auch wenn sich keine

Unterschiede in der produzierten Menge oder Löslichkeit der Proteine ergaben, wäre es interessant mittels Circular dichroismus die Sekundärstruktur der Proteine zu untersuchen.

4.3.9 Potentieller Reaktionsmechanismus von NirDL

Der Austausch der verschiedenen Aminosäuren hat gezeigt, dass die Aminosäure Arginin-139 nicht an der direkten Bindung oder Decarboxylierung des Substrats SH im aktiven Zentrum beteiligt ist. Die Aminosäuren Tyrosin-95 und Arginin-97 sind an der Koordination des Substrats beteiligt, sind aber nicht essentiell. Die Aminosäuren Arginin-218, Arginin-219, Tyrosin-263 und Lysin-314 scheinen ebenfalls an der Koordination des Substrats beteiligt zu sein. Ihre Bedeutung ist aber größer als der von Tyrosin-95 und Arginin-97. Es ist davon auszugehen, dass die Aminosäure Histidin-226 an der Koordination des Substrats beteiligt ist.

Die interessantesten Ergebnisse sind die der Varianten von H93, H261 und R265. Die Austausche der Aminosäure Histidin-93 zu Alanin, Serin und Glutamin führten alle zu einer Inaktivierung des Proteins. Die Varianten waren aber noch in der Lage das Substratanalogon FeUroIII, ebenso wie der Wildtyp, zu binden. Dies deutet darauf hin, dass die Aminosäure H93 nicht an der Koordination des Substrats aber an der Decarboxylierung der Acetatseitenketten am C12- und C18-Atom beteiligt ist, was auch die Lage in der NirDL-Struktur vermuten lässt. Der Rest der Aminosäureseitenkette von H93 deutet direkt auf die Acetatseitenkette des D-Rings. Da die Varianten des Histidins-93 komplett inaktiv waren und keine Anhäufung des Intermediats MDSH zu erkennen war, ist es denkbar, dass die Aminosäure an beiden Decarboxylierungen beteiligt ist und sowohl SH als auch MDSH von NirDL als Substrat erkannt wird. Dies würde allerdings eine Umorientierung des Substrats oder Intermediats voraussetzen. Ebenso wäre es aber auch möglich, dass dieses Histidin nur an der ersten Decarboxylierung von SH zu MDSH beteiligt ist. Die zweite Decarboxylierung würde dann durch Migration im aktiven Zentrum zu einer weiteren Bindestelle (z.B. Lage wie Produkt bei AhbA/B) erfolgen.

Die Varianten der Aminosäure Histidin-261 hingegen zeigten sowohl eine Inaktivität im Decarboxylase-Aktivitätstest als auch den Verlust der Bindung von FeUroIII. Dadurch lässt sich die Aussage treffen, dass das Histidin-261 für die Bindung des Substrats im aktiven Zentrum zuständig ist. Auch diese Aussage wird durch die NirDL-Struktur

gestützt, da der Rest dieses Histidins in direkter Nähe zu dem zentralen Eisenatom des Substrats liegt und es direkt koordiniert.

Die Variante R265A war nicht in der Lage die Umsetzung von SH zu DDSH zu katalysieren, wohingegen der Austausch derselben Aminosäure zu Lysin zu einem Verlust von ca. 50 % der Aktivität, im Vergleich zum Wildtyp, führte. Vermutlich konnte der Austausch von Arginin zu Lysin, aufgrund der ähnlichen chemischen Eigenschaften, die Aktivität zum Teil kompensieren. Leider fehlen genau für diese Varianten die Bindungsstudien, sodass es sowohl möglich ist, dass das Arginin an der direkten Bindung von SH beteiligt ist oder dass der Aminosäureaustausch keinen Einfluss auf die Bindung von SH hat und die Aminosäure-265 direkt an der Decarboxylierung beteiligt ist. Auch die Lage der Aminosäure in der NirDL-Struktur lässt keine Aussage über die Rolle für die Bindung oder die Decarboxylierung zu. Die Aminosäure befindet sich zwar in einer Reihe mit dem Histidin-261 und Tyrosin-263 allerdings zeigt der Rest von dem Substrat weg. Um eine genauere Aussage darüber zu treffen müssen die Bindungsstudien der NirDL-Varianten R265A und R265K mit dem künstlichen Substrat FeUroIII wiederholt werden.

Das aktive Zentrum mit dem gebundenen Substratanalogon und den drei Aminosäuren Histidin-93, Histidin-261 und Arginin-265 ist in Abbildung 43 dargestellt.

In der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass der Rest der Aminosäure Histidin-261 direkt unter dem zentralen Eisenatom des Substratanalogons liegt und der Rest des Histidins-93 auf die Acetatseitenkette am D-Ring zeigt. Nur der Rest der Aminosäure Arginin-265 zeigt von dem Substrat weg. Möglich wäre, dass aufgrund der Bindung eines Substratanalogons und nicht des natürlichen Substrats, die Aminosäure eine andere Position im aktiven Zentrum einnimmt. Da der Rest von einem Arginin lang und beweglich ist, gab es auch eine Elektronendichte in der Nähe des Substrats die die Vermutung zulässt, dass das Arginin-265 in die andere Richtung zum Substrat hinzeigt. Da aber die Elektronendichte durch die finale Lage besser beschrieben wurde, ist dieser Rest anders platziert worden (pers. Mitteilung Stefan Schmelz).

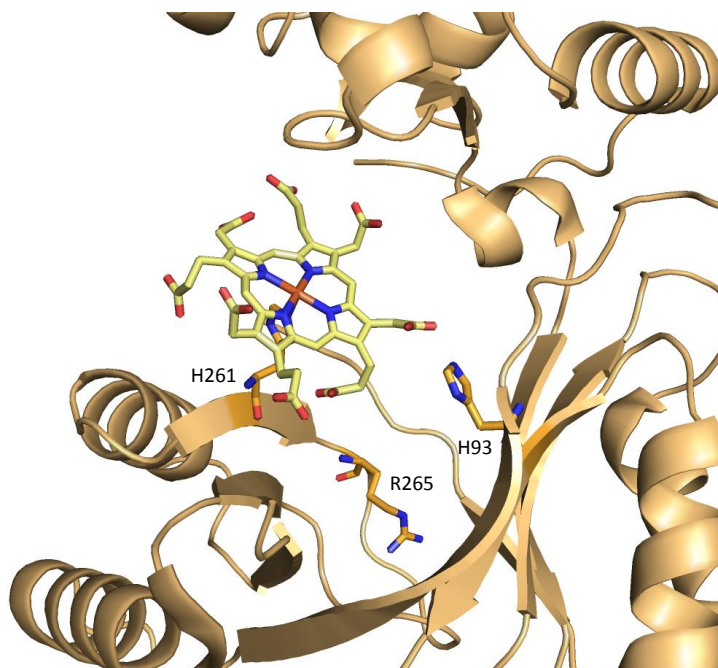


Abbildung 43: Das aktive Zentrum von NirDL mit gebundenem FeUroIII und den drei Aminosäureresten Histidin-93, Histidin-261 und Arginin-265.

Die Struktur von NirDL aus *H. thermophilus* ist in der Cartoon-Darstellung in beige, die drei Aminosäuren Histidin-93, Histidin-261 und Arginin-265, die vermutlich an Bindung und Decarboxylierung beteiligt sind, als Sticks in orange und das Substratanalogon FeUroIII ebenfalls in orange dargestellt.

Auch die Lage des Aminosäurerestes Arginin-102 in der Struktur von AhbA/B, die dem Arginin-265 bei NirDL entspricht, zeigt ins aktive Zentrum hinein (Palmer *et al.*, 2014). Dies unterstützt ebenfalls die Vermutung, dass der Rest von Arginin-265 ins aktive Zentrum und nicht nach außen zeigt.

Aufgrund der Ergebnisse wurde ein potentieller Reaktionsmechanismus aufgestellt, der in Abbildung 44 dargestellt ist.

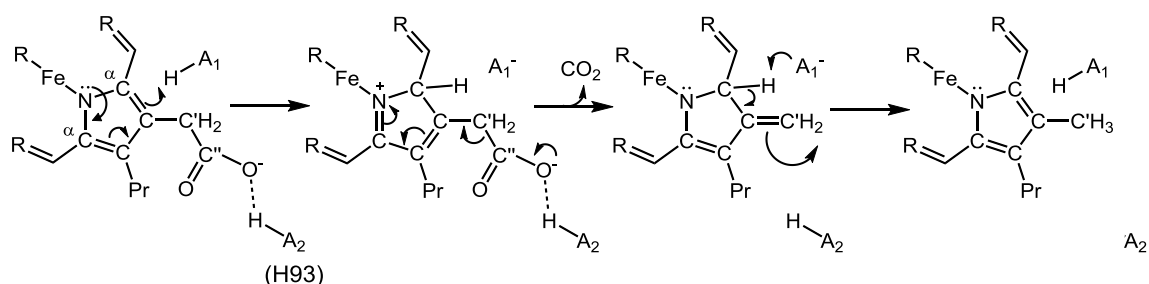


Abbildung 44: Der potentielle Mechanismus der Decarboxylierung katalysiert von NirDL.

Postulierter Reaktionsmechanismus von NirDL bei der Decarboxylierung des Substrats Sirohäm. R: Tetrapyrrol, Pr: Propionat, H-A₁: katalytisch aktive Säure 1, H-A₂: katalytisch aktive Säure 2 (Histidin-93).

Die Decarboxylierung der Acetatseitenketten durch das Enzym NirDL findet zweimal, einmal am C12-Atom des C-Rings und einmal am C18-Atom des D-Rings statt. Der postulierte Reaktionsmechanismus bedient sich dem Beispiel der Uroporphyrinogen III-

Decarboxylase (UROD bzw. HemE) die an der Häm-Biosynthese beteiligt ist. Dabei werden vier Acetatseitenketten von Uroporphyrinogen III decarboxyliert, sodass Coproporphyrinogen III entsteht (Barnard und Akhtar, 1979).

Das α -Kohlenstoffatom, in direkter Nachbarschaft der Acetatseitenkette, wird durch die katalytisch aktive Säure protoniert. Dies führt zu der Bildung eines Iminiumions und zur Schwächung der C'-C"-Bindung in der Acetatseitenkette, was dann zur Abspaltung von CO₂ führt. Das C'-Atom wird durch die zweite katalytisch aktive Säure (hier Histidin-93) protoniert und das α -Kohlenstoffatom durch die erste Säure wieder deprotoniert. Damit ist die Decarboxylierung an der Acetatseitenkette eines der C12- oder C18-Atome vollendet.

Im Falle der UROD wird postuliert, dass zwei Arginine die Rollen der Säuren übernehmen (Bushnell *et al.*, 2011). Im Falle von NirDL ist eine genaue Aussage der beiden beteiligten Aminosäuren schwierig, zwar scheint die Beteiligung des Histidins-93 an der Decarboxylierung aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit belegt, so ist die Rolle des Arginins-265 noch nicht eindeutig geklärt. Für das Arginin-265 müssen die Untersuchungen zur Bindung des Substratanalogons wiederholt werden, um zu klären, ob diese Aminosäure an der Decarboxylierung des Substrats oder der Koordination beteiligt ist. Ausgehend von der Lage der Aminosäuren Histidin-93 und Arginin-265 in der NirDL-Struktur kann aber bereits gesagt werden, dass beide Aminosäuren nicht gleichzeitig an der Decarboxylierung derselben Seitenkette beteiligt sein können, auch wenn das Arginin in das aktive Zentrum orientiert wäre. Es ist denkbar, dass das Histidin-93 an einer Decarboxylierung und das Arginin-265 an der zweiten Decarboxylierung beteiligt ist. Dabei müsste das Intermediat MDSH entlassen und gedreht wieder gebunden oder direkt an ein zweites NirDL-Molekül gedreht übergeben werden. Der Vergleich der beiden Strukturen von NirDL aus *H. thermophilus* mit dem Substratanalogon FeUroIII und AhbA/B aus *Desulfovibrio desulfuricans* (Palmer *et al.*, 2014) mit dem Produkt DDSH zeigt, dass das Substratanalogon an einer anderen Position im aktiven Zentrum gebunden ist als das Produkt der Reaktion. Dies könnte für zwei verschiedene Bindestellen des Substrats und des Intermediats sprechen. Auch die Tatsache, dass das hochkonservierte HXYXR-Motiv zweimal in der Struktur von AhbA/B und in der von NirDL vorkommt spricht für die Theorie, das SH als Substrat durch eines der Motive zu MDSH umgesetzt wird, das Intermediat entlassen, gedreht, neu gebunden und dann die zweite Decarboxylierung durch das zweite Motiv durchgeführt wird. Palmer *et al.* konnten zeigen, dass der Aminosäureaustausch von Arginin-102 von AhbB, die dem Arginin-265 von NirDL entspricht, zu einer

Inaktivierung des Proteins führte. Basierend auf diesem Ergebnis postuliert Palmer *et al.*, dass dieses Arginin an der Decarboxylierung der beiden Acetatseitenketten am C12- und C18-Atom als katalytisch aktive Säure 2 beteiligt ist. Der potentielle Reaktionsmechanismus bedient sich ebenfalls an dem Beispiel der Uroporphyrinogen III-Decarboxylase und weist der Aminosäure Arginin-102 von AhbB dieselbe Aufgabe zu, die wir zuvor dem Histidin-93 von NirDL zugewiesen haben. Da die Aminosäure R102 (AhbB), der Aminosäure R265 (NirDL) entspricht und die Ergebnisse nach dem Aminosäureaustausch ebenfalls übereinstimmen, wird die Theorie, dass im Falle von NirDL das Histidin-93 an einer und das Arginin-265 an der anderen Decarboxylierung beteiligt ist, weiter unterstützt. Allerdings wäre in diesem Fall zu erwarten gewesen, dass der Austausch der an der zweiten Decarboxylierung beteiligten Aminosäure zu einer Anhäufung des Intermediats MDSH geführt hätte. Dies war in unseren Untersuchungen nicht zu beobachten. Der Aminosäureaustausch sowohl von H93 als auch R265 führte zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Auch dazu sei nochmal erwähnt, dass der Aminosäureaustausch ebenfalls zu einer Konformationsänderung im aktiven Zentrum geführt haben könnte und dadurch keine Enzymaktivität detektierbar war. Dies könnte mittels Circular dichroismus untersucht werden.

Um auch die Lage und die Rolle des Arginins in der NirDL-Struktur erneut zu untersuchen, sollten Kokristallisationsexperimente mit dem natürlichen Substrat SH oder dem Produkt DDSH, wie im Falle von AhbA/B, durchgeführt werden. Dadurch ließe sich auch eine Aussage darüber treffen, ob die unterschiedliche Bindung des Tetrapyrrols in den Strukturen von NirDL und AhbA/B aufgrund einer Migration des Tetrapyrrols im aktiven Zentrum oder durch zwei verschiedene Bindestellen zustande kommt.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sirohäm-Decarboxylasen NirDLGH aus *Pseudomonas aeruginosa* und NirDL aus *Hydrogenobacter thermophilus* funktionell und strukturell charakterisiert.

Dabei konnte für NirDLGH aus *P. aeruginosa* als Transkriptionsregulator gezeigt werden, dass der Bereich von + 14 bp bis + 42 bp *downstream* des *nirJ*-Transkriptionsstartpunktes ebenfalls wichtig für die Regulatoraktivität von NirDLGH *in vivo* ist. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Deletion von den Genen *nirL* und *nirH* sowohl zu einem veränderten Wachstumsphänotyp führt als auch einen Einfluss auf die Regulatoraktivität hat. Die Proteine NirL und NirH scheinen als Repressor bzw. Aktivator zu fungieren, wobei die alleinige Überproduktion von NirL oder NirH im Wildtypstamm keinen Einfluss auf die Promotoraktivität hat. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei NirL und NirH um Proteine handelt die an der Feinregulation der Transkription der nachfolgenden Gene *nirJEN* beteiligt sind, diese dafür aber noch ein nicht identifiziertes Effektormolekül benötigen.

Die enzymatische Aktivität von NirDLGH aus *P. aeruginosa* konnte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden. Dabei wird das Substrat Sirohäm (SH) über das Intermediat Monodecarboxy-Sirohäm (MDSH) zu 12,18-Didecarboxy-Sirohäm (DDSH) umgesetzt. Zusätzlich wurde gezeigt, dass NirDL *in vitro* SH als Substrat nutzt und hauptsächlich eine Decarboxylierung an einer der Acetatseitenketten durchführt, sodass MDSH entsteht. NirGH kann SH nicht als Substrat verwerten sondern nutzt MDSH um es zu DDSH umzusetzen. Die Untersuchungen der *in vitro*-Enzymaktivität von NirDLGH unter Anwesenheit der *nirJ*-Promotorregion hat erste Hinweise darauf gegeben, dass die Anwesenheit der DNA keinen Einfluss auf die Aktivität der Heterodimere NirDL und NirGH hat, es allerdings zu einer Verringerung der Aktivität von NirDLGH kommen könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Struktur des NirDLGH-Homologons NirDL aus *H. thermophilus* ohne und mit dem künstlichen Substrat Eisen-Uroporphyrin III (FeUroIII) geklärt. Dabei zeigte sich, dass das Protein ein Helix-Turn-Helix-Motiv beinhaltet, das für Transkriptionsregulatoren typisch ist. Zusätzlich dazu enthält NirDL eine Substratbindedomäne, die durch die Bindung des Substratanalogons deutlich

sichtbar war. Das Substratanalogon FeUroIII konnte durch NirDL allerdings nicht umgesetzt werden. Doch ähnlich wie NirDLGH aus *P. aeruginosa* ist NirDL aus *H. thermophilus* ebenfalls in der Lage SH zu DDSH umzusetzen.

Durch den gezielten Austausch einzelner Aminosäuren und der Untersuchung der NirDL-Varianten konnte diesen Aminosäuren spezifische Aufgaben in der Enzymaktivität und Substratbindung zugeordnet werden. Dazu wurden neu etablierte Enzymaktivitätstests und Substratbindetests mithilfe von SH und FeUroIII durchgeführt. Die Aminosäure Histidin-261 ist für die Bindung und Koordinierung des Substrats im aktiven Zentrum zuständig, wohingegen das Histidin-93 direkt an der Decarboxylierung des Substrats beteiligt ist. Andere untersuchte Aminosäuren sind an der Koordination und der Kompensation der negativen Ladung der Acetat- und Propionatseitenketten des Substrats beteiligt. Ebenfalls interessant waren die Ergebnisse des Aminosäureaustauschs von Arginin-265, auch diese Aminosäure ist für die Koordination oder Decarboxylierung essentiell, in welcher Weise konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden.

Ausgehend von den Ergebnissen der NirDL-Varianten wurde ein potentieller Reaktionsmechanismus nach dem Vorbild der Uroporphyrinogen III-Decarboxylase postuliert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass NirDLGH aus *P. aeruginosa* und NirDL aus *H. thermophilus* an der Häm d_1 Biosynthese beteiligt sind. Während NirDL_{*H. th.*} Strukturelemente eines Transkriptionsregulators aufweist, konnte die regulatorische Aktivität für NirDLGH_{*P. a.*} nachgewiesen werden.

6. Summary

During this work the siroheme decarboxylases NirDLGH of *Pseudomonas aeruginosa* and NirDL of *Hydrogenobacter thermophilus* were functionally and structurally characterized.

This work showed that 28 bp between + 14 and + 42 bp downstream the *nirJ* transcriptional start site are important for the regulatory function of NirDLGH_{*P. a.*} *in vivo*. Furthermore, the deletion of the genes *nirL* and *nirH* lead to differences of the growth phenotype and the activity as a transcriptional regulator. The proteins NirL and NirH seem to act as a repressor and activator, nevertheless an overproduction of these proteins had no influence on the regulator activity. Altogether, NirL and NirH are proteins which are involved in the fine regulation of the transcription of the genes *nirJEN*. However, an additional effector molecule is needed for the regulation of *nirJEN*.

Additionally, the enzymatic activity of NirDLGH from *P. aeruginosa* was shown *in vivo* and *in vitro*. The substrate siroheme (SH) is converted to 12, 18-didecarboxy-siroheme (DDSH) via the intermediate monodecarboxy-siroheme (MDSH). The product DDSH is formed only in the presence of all four proteins NirDLGH. The heterodimeric complex NirDL uses SH as a substrate and catalyzes the conversion of SH to MDSH. NirGH is not able to utilize SH as a substrate. However, MDSH can be used as substrate and is converted into DDSH.

The *in vitro* enzyme activity assays of NirDLGH_{*P. a.*} under the presence of the *nirJ*-promoter region displayed a first evidence of the DNA influencing the activity of NirDLGH. Nevertheless, no influence on the activity of the dimeric complexes NirDL and NirGH was detected.

The crystal structure of the homologous NirDL protein from *H. thermophilus* was solved as an apo protein and in complex with the substrate analogue iron-uroporphyrin III (FeUroIII). The protein illustrated a helix-turn-helix-motif, which is characteristic for a transcription regulator. Based on the co-complex structure of NirDL_{*H. th.*} and the substrate analogue the putative active site was identified. Similarly to the activity of NirDLGH_{*P. a.*}, NirDL_{*H. th.*} was able to convert SH into DDSH. However, the substrate analogue FeUroIII was not converted by NirDL_{*H. th.*}. By employing specific amino acid exchange, specific functions for different amino acids were assigned. For instance, the amino acid histidine-261 is involved in the coordination and binding of the substrate

Summary

and the histidine-93 is directly responsible for the decarboxylation of the acetate side chains. A putative reaction mechanism based on the results of the NirDL_{*H. th.*} variants was proposed. All in all it has been shown that NirDLGH of *P. aeruginosa* and NirDL of *H. thermophilus* are involved in the heme *d*₁ biosynthesis and NirDLGH_{*P. a.*} acts as a transcriptional regulator.

7. Ausblick

In dieser Arbeit wurden die Sirohäm-Decarboxylasen NirDLGH aus *Pseudomonas aeruginosa* und NirDL aus *Hydrogenobacter thermophilus* strukturell und funktionell charakterisiert. Die dargestellten Ergebnisse werfen Fragen in folgenden Bereichen auf:

Charakterisierung von NirDLGH_{P. a.} als Transkriptionsregulator

- Klärung der Rolle der 28 bp *downstream* des *nirJ*-Gens
- Erstellung einer *nirL* und *nirH*-Doppelmutante zur Untersuchung des Einflusses beider Proteine auf die Regulation
- Identifizierung der Bedingung unter denen NirL und NirH als Regulator agieren
- Weitere Untersuchung des Einflusses der DNA auf die Enzymaktivität von NirDLGH

Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von NirDLGH_{P. a.}

- Kristallisationsversuche der Heterotetramere NirDL und NirGH sowie der Einzelproteine NirD, NirL, NirG und NirH
- Kristallisationsexperimente von NirDLGH mit *nirJ*-Promotorregion
- NMR-Studien zur Untersuchung von Monodecarboxy-Sirohäm und der Reihenfolge der Decarboxylierung an den Acetatgruppen am C12- und C18-Atom

Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von NirDL_{H. th.}

- Wiederholung der Substratbindungsstudien der NirDL-Varianten R265A, R265K und der Doppelvariante H261L+K314Q
- Kristallisationsexperimente mit dem Substrat SH oder Produkt DDSH
- Weitere Aminosäureaustausche im Bereich des aktiven Zentrums zur Identifizierung der zweiten beteiligten Aminosäure
- Identifizierung des Promotors an den das Protein bindet und die Gene die von NirDL reguliert werden
- Kokristallisation von NirDL mit DNA

8. Literaturverzeichnis

- Adamczack, J., Hoffmann, M., Papke, U., Haufschildt, K., Nicke, T., Bröring, M., Sezer, M., Weimar, R., Kuhlmann, U., Hildebrandt, P. and Layer, G. (2014), “NirN Protein from *Pseudomonas aeruginosa* is a Novel Electron-bifurcating Dehydrogenase Catalyzing the Last Step of Heme d_1 Biosynthesis”, *J Biol Chem*, Vol. 289 No. 44, pp. 30753–30762.
- Arai, H., Kanbe, H., Ishii, M. and Igarashi, Y. (2010), “Complete Genome Sequence of the Thermophilic, Obligately Chemolithoautotrophic Hydrogen-Oxidizing Bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6”, *J Bacteriol*, Vol. 192 No. 10, pp. 2651–2652.
- Arai, H., Mizutani, M. and Igarashi, Y. (2003), “Transcriptional regulation of the *nos* genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*”, *Microbiology*, No. 149, pp. 29–36.
- Arai, H., Sanbongi, Y., Igarashi, Y. and Kodama, T. (1990), “Cloning and sequencing of the gene encoding cytochrome *c*-551 from *Pseudomonas aeruginosa*”, *FEBS Lett*, No. 261, pp. 196–198.
- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M.M. and Iyer, L.M. (2005), “The many faces of the helix-turn-helix domain: Transcription regulation and beyond”, *FEMS Microbiol Rev*, No. 29, pp. 231–262.
- Bali, S., Lawrence, A.D., Lobo, S.A., Saraiva, L.M., Golding, B.T., Palmer, D.J., Howard, M.J., Ferguson, S.J. and Warren, M.J. (2011), “Molecular hijacking of siroheme for the synthesis of heme and d_1 heme”, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 108, pp. 18260–18265.
- Bali, S., Palmer, D.J., Schröder, S., Ferguson, S.J. and Warren, M.J. (2014), “Recent advances in the biosynthesis of modified tetrapyrroles: the discovery of an alternative pathway for the formation of heme and heme d_1 ”, *Cell Mol Life Sci*, No. 71, pp. 2837–2863.

- Barkigia, K.M., Chang, C.K., Fajer, J. and Renner, M.W. (1992), "Models of heme d_1 . Molecular structure and NMR characterization of an iron(III) dioxoisobacteriochlorin (porphyrindione)", *J Am Chem Soc*, No. 114, pp. 1701–1707.
- Barnard, G.F. and Akhtar, M. (1979), "Stereochemical and mechanistic studies on the decarboxylation of uroporphyrinogen III in haem biosynthesis", *J Chem Soc, Perkin Trans. 1*, pp. 2354–2360.
- Battersby, A.R., Jones, K., McDonald, E., Robinson, J.A. and Morris, H.R. (1977a), "The structure and chemistry of isobacteriochlorins from *Desulphovibrio gigas*", *Tetrahedron letters*, No. 25, pp. 2213–2216.
- Battersby, A.R., McDonald, E., Morris, H.R., Thompson, M., Williams, D.C., Bykhovsky, V.Y., Zaitseva, N.I. and Bukin, V.N. (1977b), "Biosynthesis of vitamin B₁₂: structural studies on the corriphyrins from *Propionibacterium shermanii* and the link with sirohydrochlorins", *Tetrahedron letters*, No. 25, pp. 2217–2220.
- Beale, S.I., Gough, S.P. and Granick, S. (1975), "Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley", *Proc Natl Acad Sci USA*, No. 72, pp. 2719–2723.
- Brindley, A., Zajicek, R., Warren, M.J., Ferguson, S.J. and Rigby, S. E. J. (2010), "NirJ, a radical SAM family member of the d_1 heme biogenesis cluster", *FEBS Lett*, No. 584, pp. 2461–2466.
- Bushnell, E. A. C., Erdtman, E., Llano, J., Eriksson, L.A. and Gauld, J.W. (2011), "The first branching point in porphyrin biosynthesis: A systematic docking, molecular dynamics and quantum mechanical/molecular mechanical study of substrate binding and mechanism of uroporphyrinogen-III decarboxylase", *J Comput Chem*, Vol. 32, pp. 822–834.
- Campbell, N.A., Reece, J.B. and Markl, J. (Eds.) (2003), *Biologie*, 6 // 6. Aufl, Spektrum; Spektrum Akad. Verl., Heidelberg [u.a.].
- Frankenberg, N., Moser, J. and Jahn, D. (2003), "Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application", *Appl Microbiol Biotechnol*, No. 63, pp. 115–127.

- Garnett, J.A., Marincs, F., Baumberg, S., Stockley, P.G. and Phillips, S.E. (2008), "Structure and function of the arginine repressor-operator complex from *Bacillus subtilis*", *J Mol Biol*, No. 379, pp. 284–298.
- Guerrero, S., Hecht, H.-J., Hofmann, B., Biebl, H. and Singh, M. (2001), "Production of selenomethionine-labelled proteins using simplified culture conditions and generally applicable host/vector systems", *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 56 No. 5, pp. 718–723.
- Hasegawa, N., Arai, H. and Igarashi, Y. (2001), "Two *c*-type cytochromes, NirM and NirC, encoded in the *nir* gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* act as electron donors for nitrite reductase", *Biochem Biophys Res Commun*, No. 288, pp. 1223–1230.
- Haufschildt, K., Schmelz, S., Kriegler, T.M., Neumann, A., Streif, J., Arai, H., Heinz, D.W. and Layer, G. (2014), "The crystal structure of siroheme decarboxylase in complex with iron-uroporphyrin III reveals two essential histidine residues", *J Mol Biol*, Vol. 426 No. 19, pp. 3272–3286.
- Heinemann, I.U., Jahn, M. and Jahn, D. (2008), "The biochemistry of heme biosynthesis", *Arch Biochem Biophys*, No. 474, pp. 238–251.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. and Ciofu, O. (2010), "Antibiotic resistance of bacterial biofilms", *Int J Antimicrob Ag*, No. 35, pp. 322–332.
- Ilag, L.L., Jahn, D., Eggertsson, G. and Söll, D. (1991), "The *Escherichia coli hemL* gene encodes glutamate 1-semialdehyde aminotransferase", *J Bacteriol*, No. 173, pp. 3408–3413.
- Jahn, D., Hungerer, C. and Troup, B. (1996), "Unusual pathways and environmentally regulated genes of bacterial heme biosynthesis", *Naturwissenschaften*, No. 83, pp. 389–400.
- Johannes Walther (2011), "Biosynthese des Isobakteriochlorins Häm *d*₁: Charakterisierung der Proteine NirJ und NirDLGH aus *Pseudomonas aeruginosa*", Dissertation, Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig, Braunschweig, 2011.

- Kawasaki, S., Arai, H., Kodama, T. and Igarashi, Y. (1997), "Gene Cluster for Dissimilatory Nitrite Reductase (*nir*) from *Pseudomonas aeruginosa*: Sequencing and Identification of a Locus for Heme *d*₁ Biosynthesis", *J Bacteriol*, No. 179, pp. 235–242.
- Klinke, R., Pape, H.-C. and Silbernagl, S. (Eds.) (2005), *Physiologie*, 5. komplett überarbeitete Auflage, Thieme.
- Körner, H., Sofia, H.J. and Zumft, W.G. (2003), "Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs", *FEMS Microbiol Rev*, No. 27, pp. 559–592.
- Kuroki, M., Igarashi, Y., Ishii, M. and Arai, H. (2014), "Fine-tuned regulation of the dissimilatory nitrite reductase gene by oxygen and nitric oxide in *Pseudomonas aeruginosa*", *Environ Microbiol Rep*, No. 6, pp. 792–801.
- Lanciano, P., Vergnes, A., Grimaldi, S., Guigliarelli, B. and Magalon, A. (2007), "Biogenesis of a respiratory complex is orchestrated by a single accessory protein", *J Biol Chem*, No. 282, pp. 17468–17474.
- Layer, G., Heinz, D.W., Jahn, D. and Schubert, W.-D. (2004), "Structure and function of radical SAM enzymes", *Curr Opin Chem Biol*, Vol. 8 No. 5, pp. 468–476.
- Layer, G., Reichelt, J., Jahn, D. and Heinz, D.W. (2010), "Structure and function of enzymes in heme biosynthesis", *Protein Sci*, No. 19, pp. 1137–1161.
- Liedberg, H. and Lundeberg, T. (1989), "Silver coating of urinary catheters prevents adherence and growth of *Pseudomonas aeruginosa*", *Urological Research*, Vol. 17 No. 6, pp. 357–358.
- Livermore, D.M. (1995), "beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance", *Clin. Microbiol. Rev.*, Vol. 8 No. 4, pp. 557–584.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (Eds.) (2006), *Brock - Mikrobiologie*, 11th ed., Pearson Studium.
- Mah, T.-F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S. and O'Toole, G.A. (2003), "A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance", *Nature*, No. 426, pp. 306–310.

- Meyer, J.M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C. and Holder, I.A. (1996), “Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*.”, *Infect Immun*, No. 64, pp. 518–523.
- Migula, W. (1900), “System der Bakterien, zweite Edition”, *Gustav Fischer*.
- Miller, J.H. (1972), *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Moser, J., Lorenz, S., Hubschwerlen, C., Rompf, A. and Jahn, D. (1999), “*Methanopyrus kandleri* glutamyl-tRNA reductase”, *J Biol Chem*, No. 274, pp. 30679–30685.
- Nicke, T., Schnitzer, T., Münch, K., Adamczack, J., Haufschildt, K., Buchmeier, S., Kucklick, M., Riedel, K., Felgenträger, U., Jänsch, L. and Layer, G. (2013), “Maturation of the cytochrome *cd₁* nitrite reductase NirS from *Pseudomonas aeruginosa* requires transient interactions between the three proteins NirS, NirN and NirF”, *Biosci Rep*, No. 33, pp. art:e00048.doi:10.1042/BSR20130043.
- Nurizzo, D., Silvestrini, M.C., Mathieu, M., Cutruzzolà, F., Bourgeois, D., Fülöp, V., Hajdu, J., Brunori, M., Tegoni, M. and Cambillau, C. (1997), “N-terminal arm exchange is observed in the 2.15 Å crystal structure of oxidized nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*”, *Structure*, No. 5, pp. 1157–1171.
- Palmer, D.J., Schroeder, S., Lawrence, A.D., Deery, E., Lobo, S.A., Saraiva, L.M., Mclean, K.J., Munro, A.W., Ferguson, S.J., Pickersgill, R.W., Brown, D.G. and Warren, M.J. (2014), “The structure, function and properties of sirohaem decarboxylase – an enzyme with structural homology to a transcription factor family that is part of the alternative haem biosynthesis pathway”, *Mol Microbiol*, Vol. 93 No. 2, pp. 247–261.
- Poole, K. (2001), “Multidrug Efflux Pumps and Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and Related Organisms”, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 3 No. 2, pp. 255–264.
- Remans, K., Vercammen, K., Bodilis, J. and Cornelis, P. (2010), “Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*”, *Microbiology*, No. 156, pp. 2597–2607.

- Reysenbach, A.L., Hamamura, N., Podar, M., Griffiths, E., Ferreira, S., Hochstein, R., Heidelberg, J., Johnson, J., Mead, D., Pohorille, A., Sarmiento, M., Schweighofer, K., Seshadri, R. and Voytek, M.A. (2009), "Complete and draft genome sequences of six members of the Aquificales", *J Bacteriol*, Vol. 191 No. 6, pp. 1992–1993.
- Rinaldo, S., Giardina, G., Castiglione, N., Stelitano, V. and Cutruzzolà, F. (2011), "The catalytic mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* *cd*₁ nitrite reductase", *Biochem Soc Trans*, No. 39, pp. 195–200.
- Sarah Ressel (2013), "Die enzymatische Aktivität und genregulatorische Funktion von NirDLGH aus *Pseudomonas aeruginosa*", Bachelorarbeit, Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig, Braunschweig, 2013.
- Schmid, R. and Shemin, D. (1955), "The enzymatic formation of porphobilinogen from delta-aminolevulinic acid and its conversion to protoporphyrin", *J Am Chem Soc*, No. 77, pp. 506–507.
- Schreiber, K., Krieger, R., Benkert, B., Eschbach, M., Arai, H., Schobert, M. and Jahn, D. (2007), "The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration", *J Bacteriol*, No. 189, pp. 4310–4314.
- Schröter, J. (1872), "Ueber einige durch Bakterien gebildete Pigmente", in *Beiträge zur Biologie der Pflanzen I*, Vol. 1, J. U. Kern's Verlag, pp. 109–126.
- Sharma, V., Noriega, C.E. and Rowe, J.J. (2006), "Involvement of NarK1 and NarK2 proteins in transport of nitrate and nitrite in the denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1", *Appl Environ Microbiol*, No. 72, pp. 695–701.
- Shemin, D., Russel, C.S. and Abramsky, T. (1955), "The succinate-glycine cycle I. The mechanism of pyrrole synthesis", *J Biol Chem*, No. 215, pp. 613–626.
- Shiro, Y. (2012), "Structure and function of bacterial nitric oxide reductases: nitric oxide reductase, anaerobic enzymes", *Biochim Biophys Acta*, No. 1817, pp. 1907–1913.
- Shoolingin-Jordan, P.M. (1995), "Porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen III synthase: structure, molecular biology, and mechanism", *J Bioenerg Biomembr*, No. 27, pp. 181–195.

- Silva, P.J. and Ramos, M.J. (2008), “Comparative density functional study of models for the reaction mechanism of uroporphyrinogen III synthase”, *J Phys Chem B*, No. 112, pp. 3144–3148.
- Storbeck, S., Saha, S., Krausze, J., Klink, B.U., Heinz, D.W. and Layer, G. (2011), “Crystal structure of the heme d_1 biosynthesis enzyme NirE in complex with its substrate reveals new insights into the catalytic mechanism of *S*-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferases”, *J Biol Chem*, No. 286, pp. 26754–26767.
- Storbeck, S., Walther, J., Müller, J., Parmar, V., Schiebel, H.M., Kemken, D., Dülcks, T., Warren, M.J. and Layer, G. (2009), “The *Pseudomonas aeruginosa nirE* gene encodes the *S*-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferase required for heme d_1 biosynthesis”, *FEBS J*, No. 276, pp. 5973–5982.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warren, P., Hickey, M.J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.-S., Wu, W., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R. E. W., Lory, S. and Olson, M.V. (2000), “Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen”, *Nature*, No. 406, pp. 959–964.
- Stryjewski, M.E. and Sexton, D.J. (Eds.) (2003), *Severe Infections Caused by Pseudomonas Aeruginosa: Pseudomonas Aeruginosa Infections in Specific Types of Patients and Clinical Settings*, 7th ed., Springer US.
- Swinger, K.K. and Rice, P.A. (2003), “IHF and HU: flexible architects of bent DNA”, *Curr Op in Struct Biol*, Vol. 14, pp. 28–35.
- Thaw, P., Sedelnikova, S.E., Muranova, T., Wiese, S., Ayora, S., Alonso, J.C., Brinkman, A.B., Akerboom, J., van der Oost, J. and Rafferty, J.B. (2006), “Structural insight into gene transcriptional regulation and effector binding by the Lrp/AsnC family”, *Nucleic Acids Res*, Vol. 34 No. 5, pp. 1439–1449.

- Theresa M. Kriegler (2012), “Structural work on the fusion protein NirDL from *H. thermophilus*, a putative transcription factor in heme d_1 biosynthesis”, Bachelorarbeit, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, 2012.
- Thöny-Meyer, L. (2002), “Cytochrome *c* maturation: a complex pathway for a simple task?”, *Biochem Soc Trans*, No. 30, pp. 633–638.
- Timo Kohn (2013), “Charakterisierung der genregulatorischen Funktion von NirDLGH aus *Pseudomonas aeruginosa*”, Bachelorarbeit, Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig, Braunschweig, 2013.
- Toyofuku, M., Uchiyama, H. and Nomura, N. (2012), “Social Behaviours under Anaerobic Conditions in *Pseudomonas aeruginosa*”, *Int J Microbiol*, p. 405191.
- Tristan Nicke (2013), “Untersuchungen zur Maturation der Cytochrom *cd*₁ Nitritreduktase NirS aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1”, Dissertation, Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig, Braunschweig, 2013.
- Van Alst, N. E., Sherrill, L.A., Iglewski, B.H. and Haidaris, C.G. (2009), “Compensatory periplasmic nitrate reductase activity supports anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in the absence of membrane nitrate reductase”, *Can J Microbiol*, No. 55, pp. 1133–1144.
- Williams, H.D., Zlosnik, J.E. and Ryall, B. (2007), “Oxygen, cyanide and energy generation in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*”, *Adv Microb Physiol*, No. 52, pp. 1–71.
- Winsor, G.L., Griffiths, E.J., Lo, R., Dhillon, B.K., Shay, J.A. and Brinkman, F.S. (2015), “Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database”, *Nucleic Acids Res*, doi: 10.1093.
- Winsor, G.L., Lam, D. K. W., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M.D., Yu, N.Y., Hancock, R. E. W. and Brinkman, F. S. L. (2011), “*Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes”, *Nucleic Acids Res*, Vol. 39, pp. D596-D600.
- Zajicek, R.S., Bali, S., Arnold, S., Brindley, A.A., Warren, M.J. and Ferguson, S.J. (2009), “ d_1 haem biogenesis - assessing the roles of three *nir* gene products”, *FEBS J*, No. 276, pp. 6399–6411.

- Zeytun, A., Sikorski, J., Nolan, M., Lapidus, A., Lucas, S., Han, J., Tice, H., Cheng, J.F., Tapia, R., Goodwin, L., Pitluck, S., Liolios, K., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Ovchinnikova, G., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Ngatchou-Djao, O.D., Land, M., Hauser, L., Jeffries, C.D., Han, C., Detter, J.C., Ubler, S., Rohde, M., Tindall, B.J., Göker, M., Wirth, R., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Klenk, H.P. and Kyrpides, N.C. (2011), “Complete genome sequence of *Hydrogenobacter thermophilus* type strain (TK-6)”, *Stand Genomic Sci*, Vol. 4 No. 2, pp. 131–143.
- Zumft, W.G. (1997), “Cell biology and molecular basis of denitrification”, *Microbiol Mol Biol Rev*, No. 61, pp. 533–616.
- Zumft, W.G. and Kroneck, P. M. H. (2007), “Respiratory transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by Bacteria and Archaea”, *Adv Microb Physiol*, No. 52, pp. 107–227.

9. Anhang

Die folgende Abbildung zeigt die Wachstumskurve der Komplementationsexperimente mit den Vektoren pUCP20*TnirL* und pUCP20*TnirH* aus Kapitel 4.1.2.

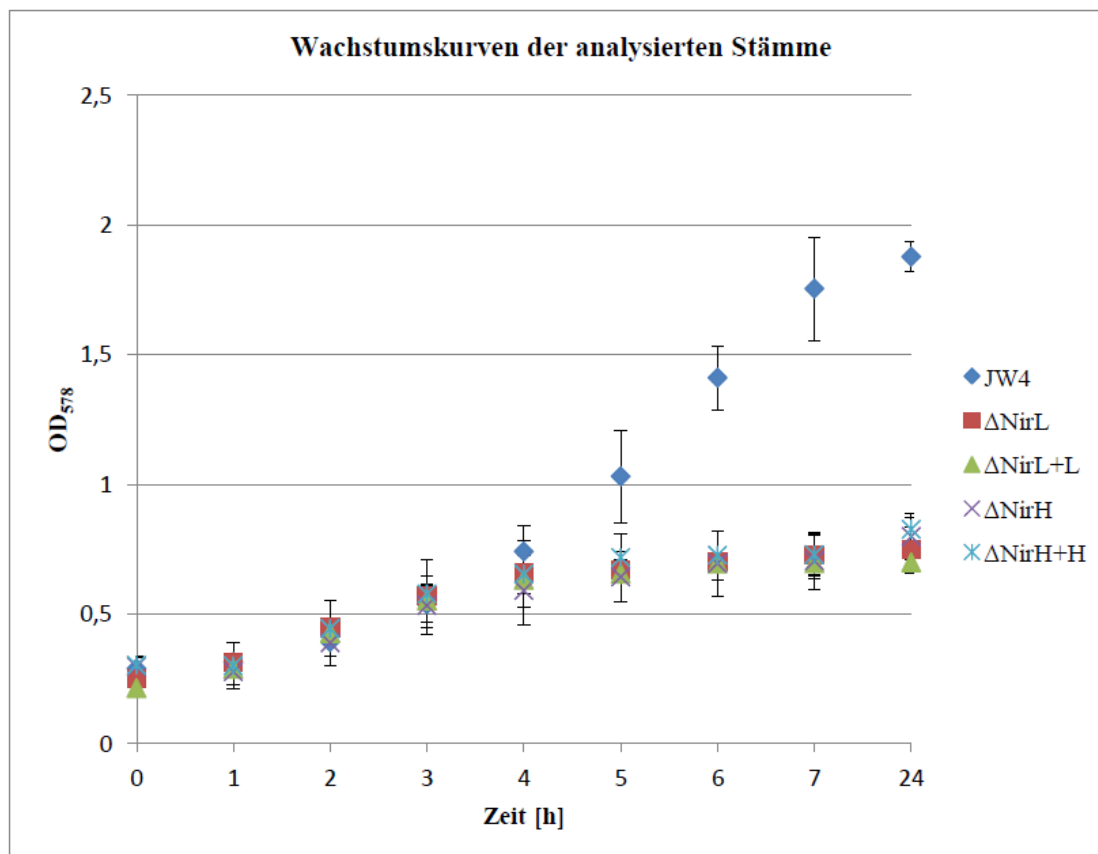


Abbildung A1: Wachstumsanalysen der *P. aeruginosa*-Stämme PAO1Δ*nirL*JW4, PAO1Δ*nirL*JW4+pUCP20*TnirL*, PAO1Δ*nirH*JW4 und PAO1Δ*nirH*JW4+pUCP20*TnirH*

Die Kurve JW4 zeigt die ermittelten Messdaten des *P. aeruginosa*-Stamms PAO1-JW4. Dieser Stamm diente als Positivkontrolle, ohne Mutation im *nir*-Operon und mit in das Genom integriertem Reportergen. Die Kurve Δ*NirL* zeigt die gemessenen Daten der Deletion PAO1Δ*nirL*-JW4. Δ*NirL*+L zeigt die Messdaten der Komplementation PAO1Δ*nirL*-JW4+pUCP20*TnirL*. Die Messdaten der Deletion PAO1Δ*nirH*-JW4 sind in Kurve Δ*NirH* gezeigt. Die Ergebnisse der Messungen des Stamms PAO1Δ*nirH*-JW4+pUCP20*TnirH* sind in Kurve Δ*NirH*+H aufgetragen. Abgebildet ist die optische Dichte bei 578 nm gegen die Zeit in Stunden (Timo Kohn, 2013).

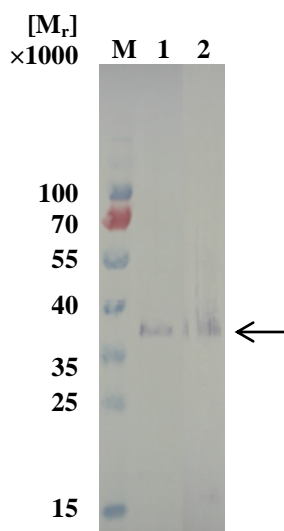


Abbildung A2: Untersuchung auf NirN mittels α -NirN-Antikörper.

Spur M: Proteingrößenstandard mit angegebenen relativen Molekülmassen $[M_r] \times 1000$. Gezeigt ist das Protein NirN (Pfeil) aus den Stämmen PAO1 Δ nirLJW4 (Spur 1) und PAO1 Δ nirHJW4 (Spur 2) mittels α -NirN-Antikörper detektiert und BCIP/NBT gefärbt.

Tabelle A1: Datensammlung und Verfeinerungsstatistik der Strukturen NirDL und NirDL+FeUroIII.

	NirDL (apo)	NirDL + FeUroIII
Wavelength (Å)	0.999	1.542
Resolution range (Å) ^a	24.3 - 2.0 (2.1 - 2.0)	28.7 - 2.9 (3.0 - 2.9)
Space group	C2	C2
Unit cell		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	101.4, 72.1, 51.2	103.6, 72.6, 51.1
α , β , γ (°)	90.0, 100.4, 90.0	90.0, 102.1, 90.0
Total reflections ^a	108099 (13957)	25161 (1573)
Unique reflections ^a	24244 (3131)	8137 (567)
Multiplicity ^a	4.5 (4.5)	3.1 (2.8)
Completeness (%) ^a	98.6 (94.3)	97.8 (92.6)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>) ^a	23.3 (3.0)	22.7 (2.6)
Rmerge ^a	0.031 (0.471)	0.035 (0.440)
Rwork	0.225	0.229
Rfree	0.271	0.284
Number of non-hydrogen atoms	2618	2571
macromolecules	2546	2507
ligands		61
water	72	3
Protein residues	309	305
RMS(bonds) (Å)	0.003	0.01
RMS(angles) (°)	0.77	1.67
Ramachandran plot favored (%)	98	97
Ramachandran plot outliers (%)	0.33	0
Clashscore	6.03	11.12
Average B-factor (Å ²)		
macromolecules	60.5	50.36
ligands		114.4
solvent	56.8	51.48
PDB code	4CH7	4CZC

^a Die Werte für die höchste Auflösung sind in Klammern dargestellt.

Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1</u> : Der Stickstoffkreislauf.....	2
<u>Abbildung 2</u> : Regulation der Denitrifikation.....	5
<u>Abbildung 3</u> : Das <i>nir</i> -Operon in <i>P. aeruginosa</i>	7
<u>Abbildung 4</u> : Kristallstruktur der Nitritreduktase NirS aus <i>P. aeruginosa</i>	7
<u>Abbildung 5</u> : Die Grundstruktur aller zirkulären Tetrapyrrole	9
<u>Abbildung 6</u> : Die Uroporphyrinogen III-Biosynthese.....	11
<u>Abbildung 7</u> : Die Biosynthese von Häm d_1	12
<u>Abbildung 8</u> : Kristallstruktur von NirE im Komplex mit Substrat und SAH	14
<u>Abbildung 9</u> : Schematische Darstellung eines Helix-Turn-Helix-Motivs	17
<u>Abbildung 10</u> : Der potentielle Promotorbereich <i>upstream</i> von <i>nirJ</i> aus <i>P. aeruginosa</i>	17
<u>Abbildung 11</u> : Schematische Darstellung der untersuchten <i>nirJ</i> -Promotor/Reporter- genkonstrukte.....	54
<u>Abbildung 12</u> : Wachstumskurven von <i>P. aeruginosa</i> PAO1-Stämmen mit verschiedenen Reporter- genkonstrukten.....	55
<u>Abbildung 13</u> : β -Galactosidaseaktivität der verschiedenen Reporter- genkonstrukte im Vergleich zur Negativkontrolle PAO1JW0	56
<u>Abbildung 14</u> : A: Anaerobe Wachstumsuntersuchung der <i>P. aeruginosa</i> - Deletionsmutante PAO1 Δ <i>nirLJW4</i> sowie der komplementierten Mutante PAO1 Δ <i>nirLJW4</i> +pUCP20 <i>TnirDLGH</i> und des Positivkontrollstamms PAO1JW4. B: β -Galactosidase Enzymaktivitätstest für die <i>P. aeruginosa</i> -Deletionsmutante PAO1 Δ <i>nirLJW4</i> sowie der komplementierten Mutante PAO1 Δ <i>nirLJW4</i> +pUCP20 <i>TnirDLGH</i> und des Positivkontrollstamms PAO1JW4.....	58
<u>Abbildung 15</u> : A: Anaerobe Wachstumsuntersuchung der <i>P. aeruginosa</i> - Deletionsmutante PAO1 Δ <i>nirHJW4</i> sowie der komplementierten Mutante PAO1 Δ <i>nirHJW4</i> +pUCP20 <i>TnirDLGH</i> , des Positivkontrollstamms PAO1JW4 und des Negativkontrollstamms PAO1JW0. B: β -Galactosidase Enzymaktivitätstest für die <i>P. aeruginosa</i> -Deletionsmutante PAO1 Δ <i>nirHJW4</i> sowie der komplementierten Mutante PAO1 Δ <i>nirHJW4</i> +pUCP20 <i>TnirDLGH</i> , des Positivkontrollstamms PAO1JW4 und des Negativkontrollstamms PAO1JW0	60
<u>Abbildung 16</u> : A: Anaerobe Wachstumsuntersuchung der <i>P. aeruginosa</i> -Stämme PAO1JW0, PAO1JW4, PAO1JW4+pUCP20 <i>TnirL</i> und PAO1JW4+pUCP20 <i>TnirH</i> B: β -Galactosidase Enzymaktivitätstest für die <i>P. aeruginosa</i> -Stämme PAO1JW0, PAO1JW4, PAO1JW4+pUCP20 <i>TnirL</i> und PAO1JW4+pUCP20 <i>TnirH</i>	62
<u>Abbildung 17</u> : Chromatogramme der extrahierten Tetrapyrrole aus den <i>in vivo</i> - Enzymaktivitätsanalysen	66
<u>Abbildung 18</u> : Isotopisches Massenspektrum nach HPLC-Trennung.....	68
<u>Abbildung 19</u> : SDS-PAGE-Analyse der Produktion und Affinitätschromatographie von NirDL.....	69

<u>Abbildung 20</u> : SDS-PAGE-Analyse der Produktion und Affinitätschromatographie von NirGH.....	70
<u>Abbildung 21</u> : HPLC-Chromatogramme der Tetrapyrrole nach <i>in vitro</i> -Enzymaktivität von NirDLGH aus <i>P. aeruginosa</i>	71
<u>Abbildung 22</u> : Chromatographische Analyse der Tetrapyrrole aus den verschiedenen <i>in vitro</i> -Enzymaktivitätstests mit zellfreiem CysG-Extrakt und den Proteinen NirDL (A), NirGH (B), NirDLGH (C) und NirDL + NirGH (D) aus <i>P. aeruginosa</i>	73
<u>Abbildung 23</u> : Schematische Darstellung der Decarboxylierung von Sirohäm durch NirDLGH aus <i>P. aeruginosa</i>	74
<u>Abbildung 24</u> : Chromatographische Analyse der <i>in vitro</i> -Enzymtests von NirDLGH mit DNA-Fragment	76
<u>Abbildung 25</u> : SDS-PAGE-Analyse der Produktion und Affinitätschromatographie von NirDL aus <i>H. thermophilus</i>	78
<u>Abbildung 26</u> : Chromatographische Analyse der <i>in vitro</i> -Enzymaktivität mit zellfreiem CysG-Extrakt und dem Protein NirDL aus <i>H. thermophilus</i>	80
<u>Abbildung 27</u> : Kristallstruktur von NirDL aus <i>H. thermophilus</i>	81
<u>Abbildung 28</u> : Helix-Turn-Helix-Motiv von NirDL im Vergleich zu AhrC aus <i>B. subtilis</i>	83
<u>Abbildung 29</u> : Strukturen des Substrats Sirohäm und dessen Analogons Fe-Uroporphyrin III.....	84
<u>Abbildung 30</u> : Die Struktur von NirDL im Komplex mit FeUroIII im Vergleich zur apo-Struktur von NirDL	84
<u>Abbildung 31</u> : Strukturvergleich von AhbA/B mit Produkt und NirDL mit Substratanalogon	87
<u>Abbildung 32</u> : Chromatographische Analyse des <i>in vitro</i> -Enzymtests mit FeUroIII und NirDL	89
<u>Abbildung 33</u> : Strukturbasiertes Aminosäuresequenzalignement von NirDL verschiedener Organismen	91
<u>Abbildung 34</u> : Das aktive Zentrum von NirDL mit FeUroIII und den zum Austausch ausgewählten Aminosäuren.....	93
<u>Abbildung 35</u> : Chromatographische Analyse des Enzymaktivitätstests der NirDL-Varianten mit WT-ähnlicher Enzymaktivität	95
<u>Abbildung 36</u> : Chromatographische Analyse des Enzymaktivitätstests der NirDL-Varianten mit keiner oder sehr geringer Enzymaktivität	97
<u>Abbildung 37</u> : Chromatographische Analyse des Enzymaktivitätstests der NirDL-Varianten mit verringerter Enzymaktivität	98
<u>Abbildung 38</u> : UV/Vis-Spektrum des wt-NirDL mit gebundenem FeUroIII und FeUroIII ohne Protein	99
<u>Abbildung 39</u> : UV/Vis-Spektren der NirDL-Varianten H93A, H93S, H93Q, R139A und R139K mit FeUroIII.....	100
<u>Abbildung 40</u> : UV/Vis-Spektren der NirDL-Varianten R97K und R218K mit FeUroIII.....	101

<u>Abbildung 41</u> : UV/Vis-Spektren der Varianten Y95L, R218A, R219Q, Y263F und K314Q mit FeUroIII	102
<u>Abbildung 42</u> : UV/Vis-Spektren der Varianten H226Q, H261A und H261S mit FeUroIII	103
<u>Abbildung 43</u> : Das aktive Zentrum von NirDL mit gebundenem FeUroIII und den drei Aminosäureresten Histidin-93, Histidin-261 und Arginin-265	110
<u>Abbildung 44</u> : Der potentielle Mechanismus der Decarboxylierung katalysiert von NirDL.....	110
<u>Abbildung A1</u> : Wachstumsanalysen der <i>P. aeruginosa</i> -Stämme PAO1 Δ nirLJW4, PAO1 Δ nirLJW4+pUCP20TnirL, PAO1 Δ nirHJW4 und PAO1 Δ nirHJW4+pUCP20TnirH.....	127
<u>Abbildung A2</u> : Untersuchung auf NirN mittels α -NirN-Antikörper	128

Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1</u> : Geräteliste	19
<u>Tabelle 2</u> : Verwendete Oligonukleotide	21
<u>Tabelle 3</u> : Verwendete Bakterienstämme	24
<u>Tabelle 4</u> : Verwendet Plasmide.....	25
<u>Tabelle 5</u> : In der Arbeit verwendete Antibiotika	30
<u>Tabelle 6</u> : PCR-Temperaturprogramm zur Überprüfung des Matings	34
<u>Tabelle 7</u> : Allgemeines Temperaturprogramm der PCR.....	36
<u>Tabelle 8</u> : Katalytische Aktivität und FeUroIII-Bindung von wt-NirDL aus <i>H. thermophilus</i> und den NirDL-Varianten	104
<u>Tabelle A1</u> : Datensammlung und Verfeinerungsstatistik der Strukturen NirDL und NirDL+FeUroIII.....	128

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Gunhild Layer dafür bedanken, dass ich meine Doktorarbeit an einem sehr interessante Thema in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen konnte. Vielen Dank für die Unterstützung, Motivation und der immer offenen Tür bei allen Fragen. Außerdem bin ich dankbar für die vielen Erfahrungen und die Möglichkeit der Teilnahme an nationalen und internationalen Konferenzen, die mich sehr viel haben lernen lassen.

Bei Prof. Dr. Dieter Jahn möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens, die Ideen und Anregungen während der Institutsseminare und die Möglichkeiten in seinem Institut sehr herzlich bedanken.

Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Vorsitzes meiner Prüfungskommission.

Dem gesamten Institut für Mikrobiologie möchte ich für die tolle Arbeitsatmosphäre danken. Ganz besonders seien dabei Daniela Schnobel, Christina Nitzsche und Bernd Hoppe erwähnt. Vielen Dank für eure Arbeit und Mühe sowie der Navigation durch den sich ständig ändernden Antrags- und Abrechnungsdschungel. Dagmar Rose und Barbara Cwiklinski möchte ich für ihre tägliche Arbeit danken. Ihr habt uns allen die Arbeit sehr erleichtert. Außerdem möchte ich noch Dr. Martina Jahn, Dr. Rebekka Biedendieck, Dr. Elisabeth Härtig sowie Dr. Max Schobert für die Hilfe und Tipps in allen Lebenslagen danken.

Meinen Kooperationspartnern Alexander Neumann und Michael Maczka vom Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig möchte ich für die Hilfe bei den LC-MS Messungen danken. Außerdem danke ich Dr. Stefan Schmelz und Theresa Kriegler vom HZI Braunschweig für die Strukturaufklärung von NirDL und die unendlichen Stunden Arbeit die sie in das Thema gesteckt haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Layer Tristan, Judith, Hannes, Mela, Julia, Tobi, Katja und Linda für die vielen tollen gemeinsamen Stunden im Labor, auf Konferenzen und abseits davon bedanken. Die fachlichen und allgemeinen Diskussionen waren immer eine große Bereicherung ebenso

wie die „beklopten 5-Minuten“. „Ich wünsche euch ein schönes Wochenende. Das schönste Wochenende der Weeeeelt.“

Auch meinen Bachelorstudenten Timo Kohn und Sarah Ressel gilt mein Dank, für die hervorragende Arbeit die sie an dem Thema geleistet haben.

Außerdem danke ich Dr. Jürgen Moser und seiner Arbeitsgruppe für die gemeinsamen Freitagsseminare, den Ideen & Tipps aus den unterschiedlichsten Blickwinkeln und der immer bestehenden Diskussionsbereitschaft.

Der Doktorandeninitiative möchte ich dafür danken, dass sie sich den Interessen und Belange von allen Doktoranden annehmen und durch regelmäßige Treffen den Zusammenhalt unter den Doktoranden stärken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei denen die Teile dieser Arbeit gelesen haben. Tristan, Maike, Julia, Nadine, Marcel und Mareike. Entschuldigung.

Auch den Doktoranden anderer Arbeitsgruppen gilt mein Dank für die tolle gemeinsame Zeit, Hilfe, Unterstützung und euer offenes Ohr. Danke – Wiebke, Anka, Elena, Julia, Sandra, Conny, Christiane, Nadine und Mareike.

Hendrik – Danke für deine damalige Unterstützung.

Meinen Freunden aus Bremerhaven, Oldenburg, Braunschweig oder wo auch immer ihr mittlerweile gelandet seid – Ich danke euch für eure Unterstützung und Motivation in allen Lebenslagen. Ihr habt mich immer motiviert, mir gut zuredet oder mich einfach erfolgreich abgelenkt. Es tut mir leid, wenn ich euch manchmal mit meinem Fachchinesisch und dem Gerede über die Arbeit genervt habe.

Marcel – Auch bei dir müsste ich mich für das Fachchinesisch entschuldigen, aber ich belasse es lieber bei meinem Dank für deine Unterstützung, dein offenes Ohr und deine Liebe. Danke, dass du manchmal mehr an mich glaubst, als ich an mich selbst.

Abschließend danke ich von ganzem Herzen meiner Familie, ohne die mein Studium und diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre. Lydia, Peter und Karina – Ich danke euch für finanzielle und seelische Unterstützung in privaten und beruflichen Dingen. Danke für viele Telefonate, eure Beratung bei Entscheidungen sowie eure Sichtweise auf mich und das Leben.